

# **Physikochemische Charakterisierung von Poloxamer 407-haltigen Systemen für den potentiellen Einsatz von 5-Aminolävulinsäure in der photodynamischen Therapie**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Carlos van Hemelrijck  
aus Lima/Peru

1. Referentin:	Professorin Dr. Christel Müller-Goymann
2. Referent:	Professor Dr. Rolf Daniels
eingereicht am:	19.12.2011
mündliche Prüfung (Disputation) am:	25.07.2012

Druckjahr 2012

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

van Hemelrijck, C. & Müller-Goymann, C.C.: Characterization of a pseudo ternary phase diagram of poloxamer 407 systems for potential application of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy. International Journal of Pharmaceutics 420(2):297-303 (2011).

### **Tagungsbeiträge**

van Hemelrijck, C. & Müller-Goymann, C.C.: Influence of the content of isopropyl alcohol and dimethylisosorbide on the thermogelification of semisolid and liquid poloxamer 407-systems (Poster). 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Barcelona (2008).

van Hemelrijck, C. & Müller-Goymann, C.C.: Physikochemische Charakterisierung von Poloxamer 407-haltigen Systemen für die dermale Applikation (Poster). Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft Jahrestagung, Bonn (2008).

van Hemelrijck, C. & Müller-Goymann, C.C.: Stability aspects of poloxamer 407-based drug delivery systems in photodynamic therapy (Poster). Skin and Formulation, 3rd Symposium & Skin Forum, 10th Annual Meeting, Versailles (2009).

van Hemelrijck, C. & Müller-Goymann, C.C.: Unterschiede bezüglich der Konsistenz und der Gelierungstemperatur von Systemen aus Poloxamer 407 verschiedener Hersteller (Poster). Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft Jahrestagung, Jena (2009).

van Hemelrijck, C. & Müller-Goymann, C.C.: Physicochemical characterization of poloxamer-407 systems for potential dermal application of 5-aminolevulinic acid (Poster). Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft Doktorandentagung, Pichlarn-Aigen (2009)

van Hemelrijck, C. & Müller-Goymann, C.C.: Rheological characterization of poloxamer 407 formulations for dermal application (Poster). 7th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Malta (2010).



**Für Frauke**



Nicht in der Erkenntnis liegt das Glück,  
sondern im Erwerben der Erkenntnis.

**Edgar Allan Poe**





Die vorliegende Arbeit entstand unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. C.C. Müller-Goymann am Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

Frau Prof. Dr. C.C. Müller-Goymann

danke ich für die Zuweisung des interessanten Themas, für die erwiesene Unterstützung bei dessen Bearbeitung und für die freundliche und persönliche Betreuung.

Herrn Prof. Dr. R. Daniels danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Frau Dr. Nadja Grüning danke ich für die freundliche und kollegiale Einarbeitung in die Thematik und für die stetige Hilfsbereitschaft. Ebenso danke ich Frau Dr. Meike Harms für die sehr ausführliche Einführung in die „Welt der vernachlässigten Dimensionen“.

Herrn Prof. Dr. A. Fahr und Herrn Alexander Mohn vom Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller Universität Jena danke ich dafür, dass sie mir ermöglicht haben an ihrem Institut Röntgenkleinwinkelmessungen durchzuführen.

Mein weiterer Dank gilt allen technischen und wissenschaftlichen MitarbeiterInnen des Instituts für Pharmazeutische Technologie für die gute Arbeitsatmosphäre und für die hilfreiche Unterstützung. Insbesondere möchte ich mich bei Dr. Lusiana und Joana Fokuhl für die gute Zusammenarbeit und die stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft bedanken. Außerdem danke ich Carmen Gröchte-meier, Manuela Handt, Ursula Jahn, Britta Meier, Kirsten Nebelung und Juliane Schildt für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung verschiedener Messungen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Dr. S. Czech für die Bereitstellung von Hautpenden für Permeationsuntersuchungen. Ebenso bedanke ich mich bei den Firmen BASF, Dolorgiet GmbH & Co. KG, Medac GmbH und Sasol Germany GmbH für die freundliche Bereitstellung von Materialien.

Mein herzlichster Dank geht an meine Familie, insbesondere an meine Frau Frauke, für ihre Unterstützung während der ganzen Promotionszeit und dafür, dass sie immer für mich da sind.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Allgemeiner Teil.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Photodynamische Therapie (PDT) .....</b>	<b>3</b>
2.1.1	Geschichte .....	3
2.1.2	Wirkmechanismus.....	4
2.1.3	Photosensibilisatoren und ihre Aufnahme ins Gewebe .....	5
2.1.4	Fertigarzneimittel für die PDT.....	6
<b>2.2</b>	<b>5-Aminolävulinsäure (ALA).....</b>	<b>7</b>
2.2.1	Topischer Einsatz von ALA in der PDT .....	8
2.2.2	Problematik .....	9
2.2.3	Verbesserung der Bioverfügbarkeit.....	11
2.2.3.1	Chemische Modifikationen .....	11
2.2.3.2	Optimierung der Formulierung .....	12
2.2.3.3	Physikalische Methoden .....	13
<b>2.3</b>	<b>Poloxamer 407 (POX).....</b>	<b>15</b>
2.3.1	Polymere für die dermale Applikation.....	15
2.3.2	Poloxamere .....	16
2.3.3	Thermoreversible Eigenschaften.....	17
2.3.4	Flüssigkristalline Strukturen .....	19
2.3.5	Einsatz in der Pharmazie .....	22
2.3.5.1	Anwendung als Gelbildner .....	22
2.3.5.2	Solubilisierende Eigenschaften .....	22
2.3.5.3	Stabilisierende Eigenschaften .....	23
2.3.5.4	Bioadhäsive Eigenschaften .....	23
2.3.5.5	Kontrollierte Freisetzung .....	24
<b>2.4</b>	<b>Die Haut .....</b>	<b>25</b>
2.4.1	Funktion und Aufbau der menschlichen Haut .....	25
2.4.2	Aufbau des Stratum corneums .....	26
2.4.3	Mikrostruktur des Stratum corneums .....	27
2.4.4	Permeationswege für Arzneistoffe .....	30
2.4.5	Permeationsverbesserung .....	31

2.4.6	Quantifizierung der Arzneistoffaufnahme durch die Haut.....	33
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>35</b>
<b>3.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>37</b>
3.2.1	Herstellung der arzneistofffreien Grundlagen und der lidocainhaltigen Zubereitungen .....	37
3.2.2	Einarbeitung von ALA .....	37
3.2.3	Graphische Darstellung in einem Mischungsdreieck.....	38
3.2.4	Makroskopische Charakterisierung .....	39
3.2.5	Mikroskopische Charakterisierung .....	39
3.2.5.1	Polarisationsmikroskopie (PolMik).....	39
3.2.5.2	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	40
3.2.6	Rheologische Untersuchungen .....	40
3.2.6.1	Bestimmung des linear viskoelastischen Bereiches (LVEB) ...	40
3.2.6.2	Charakterisierung der Konsistenz .....	41
3.2.6.3	Bestimmung des Thermogelierungspunktes (TGP).....	42
3.2.7	Röntgenuntersuchungen.....	42
3.2.7.1	Röntgenweitwinkelbeugung (WAXD) .....	43
3.2.7.2	Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXD) .....	44
3.2.8	Gewinnung, Isolierung und Aufbewahrung des humanen Stratum corneums .....	44
3.2.9	Permeationsuntersuchungen .....	45
3.2.9.1	Permeationsuntersuchungen mit ALA .....	46
3.2.8.2	Permeationsuntersuchungen mit Lidocain.....	46
3.2.10	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) .....	47
3.2.10.1	HPLC-Analytik von ALA .....	47
3.2.9.1.1	Vorsäulenderivatisierung.....	47
3.2.9.1.2	Quantifizierung mittels HPLC .....	48
3.2.9.2	HPLC-Analytik von Lidocain.....	48
3.2.11	Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC).....	49
3.2.11.1	Ermittlung des Schmelzpunktes .....	49
3.2.11.2	Untersuchung von Interaktionen zwischen Stratum corneum und den Grundlagen .....	49
3.2.12	Kernspinresonanzspektroskopie ( <sup>1</sup> H-NMR).....	50

3.2.13	Infrarotspektroskopie (IR-Spektroskopie) .....	50
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1</b>	<b>Charakterisierung eines pseudoternären Mischungsdreiecks ..</b>	<b>51</b>
4.1.1	Makroskopische Charakterisierung .....	51
4.1.2	Mikroskopische Charakterisierung .....	54
4.1.2.1	Polarisationsmikroskopie (PolMik).....	54
4.1.2.2	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	56
4.1.3	Röntgenweitwinkelbeugung (WAXD) .....	57
4.1.4	Rheologische Untersuchungen .....	62
4.1.4.1	Bestimmung des linear viskoelastischen Bereiches (LVEB) ...	62
4.1.4.2	Charakterisierung der Konsistenz .....	64
4.1.4.3	Bestimmung des Thermogelierungspunktes (TGP).....	66
4.1.5	Stabilitätsuntersuchungen .....	70
4.1.5.1	Makroskopische Charakterisierung .....	70
4.1.5.2	Polarisationsmikroskopie .....	73
4.1.5.3	Röntgenweitwinkelbeugung (WAXD) .....	75
<b>4.2</b>	<b>Untersuchung des Einflusses der Komponenten auf ausgewählte physikochemische Eigenschaften .....</b>	<b>79</b>
4.2.1	Rheologische Untersuchungen .....	80
4.2.1.1	Charakterisierung der Konsistenz .....	81
4.2.1.1.1	Konsistenz der wirkstofffreien Zubereitungen .....	81
4.2.1.1.2	Konsistenz der Zubereitungen mit ALA.....	84
4.2.1.1.3	Konsistenz der Zubereitungen mit Lidocain .....	86
4.2.1.2	Bestimmung des Thermogelierungspunktes (TGP).....	88
4.2.2	Permeationsuntersuchungen .....	90
4.2.2.1	Permeationsuntersuchungen mit ALA .....	91
4.2.2.2	Permeationsuntersuchungen mit Lidocain.....	95
4.2.2.3	Vergleich der Permeationsfluxe von ALA und Lidocain .....	98
4.2.3	DSC-Untersuchungen .....	100
4.2.3.1	DSC-Untersuchungen mit wirkstofffreien Grundlagen .....	101
4.2.3.2	DSC-Untersuchungen mit ALA-haltigen Zubereitungen .....	104
4.2.3.3	DSC-Untersuchungen mit lidocainhaltigen Zubereitungen ...	105
4.2.4	Röntgenkleinwinkeluntersuchungen (SAXD) .....	106
4.2.4.1	SAXD der wirkstofffreien Grundlagen.....	106

4.2.4.2	Untersuchungen mit ALA und Temperatureffekte.....	114
<b>4.3</b>	<b>Untersuchungen von Poloxamer 407 verschiedener Hersteller .....</b>	<b>117</b>
4.3.1	Makroskopische Charakterisierung .....	117
4.3.2	Rheologische Untersuchungen .....	118
4.3.3	WAXD-Untersuchungen .....	120
4.3.4	DSC-Untersuchungen .....	123
4.3.5	IR-Spektroskopie.....	124
4.3.6	Kernspinresonanzspektroskopie ( $^1\text{H}$ -NMR).....	124
<b>5</b>	<b>Abschlussdiskussion .....</b>	<b>126</b>
5.1	Charakterisierung eines pseudoternären Mischungsdreiecks	126
5.2	Stabilität der Systeme innerhalb des pseudoternären Mischungsdreiecks.....	128
5.3	Einfluss der enthaltenen Komponenten auf ausgewählte physikochemische Eigenschaften .....	129
5.4	Korrelation zwischen den untersuchten physikochemischen Eigenschaften .....	134
5.5	Chargenkonformität von Poloxamer 407 verschiedener Hersteller .....	136
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>137</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>139</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ALA	5-Aminolävulinsäure
ALAS	5-Aminolävulinat-Synthase
CMC	kritische Mizellbildungskonzentration (Critical micelle concentration)
COPRO	Coproporphyrinogen
CPHY	2,5-( $\beta$ -Carboxyethyl)dihydropyrazin
CPY	2,5-( $\beta$ -Carboxyethyl)pyrazin
DAB	Deutsches Arzneibuch
DAC	Deutscher Arzneimittel-Codex
DHE	Dihämatoporphyrin-Ester
DMIS	Dimethylisosorbid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSC	Dynamische Differenzkalorimetrie (Differential scanning calorimetry)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EO	Ethylenoxid
EtOH	Ethanol
FAG	Poloxamer 407 von Fagron
HALA	ALA-Hexylester
HLB	Hydrophilic-lipophilic-balance
$^1\text{H-NMR}$	Kernspinresonanzspektroskopie (Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy)
HPD	Hämatoporphyrin-Derivate
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High performance liquid chromatography)
IPA	Isopropanol
IR	Infrarot
LDL	Lipoprotein niederer Dichte (Low density lipoprotein)
LED	Light-emitting diode
LUT	Lutrol <sup>®</sup> F 127
LVEB	Linear viskoelastischer Bereich
MAOP	Methyl-(5-amino-4-oxopentanoat)

---

MIG	Miglyol® 840
OPA	o-Phthaldialdehyd
O/W	Öl-in-Wasser
PBG	Porphobilinogen
PBGD	Porphobilinogen-Desaminase
PDT	Photodynamische Therapie
PE	Polyethylenoxid
PeEnh	Permeationsenhancer
PEG	Polyethylenglykol
PG	Propylenglykol
PLU	Pluronic® F 127
PO	Propylenoxid
PolMik	Polarisationsmikroskopie
POX	Poloxamer 407
PP	Polypropylenoxid
PpIX	Protoporphyrin IX
PROTO	Protoporphyrinogen
SAXD	Röntgenkleinwinkelbeugung (Small angle X-ray diffraction)
SC	Stratum corneum
SD	Standardabweichung
SYN	Synperonic® PE/F 127
TGP	Thermogelierungspunkt
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
URO	Uroporphyrinogen
UV	Ultraviolett
WAXD	Röntgenweitwinkelbeugung (Wide angle X-ray diffraction)
WHS	Wasserhaltige Hydrophile Salbe
W/O/W	Wasser-in-Öl-in-Wasser



# 1 Einleitung

Die topische Applikation von 5-Aminolävulinsäure (ALA) in der photodynamischen Therapie (PDT) hat sich seit ihrer Einführung Anfang der 1990er Jahre als eine sehr gute Alternative zur Behandlung von aktinischen Keratosen und Basalzellkarzinomen etabliert. Allerdings ist die Bioverfügbarkeit dieses Wirkstoffes aufgrund seiner Polarität und der damit verbundenen schlechten Resorption durch die Haut sehr begrenzt. Eine gute Möglichkeit den Wirkstoff durch die Haut zu schleusen ist eine chemische Modifizierung [Fotinos et al., 2006], wobei die Wirkstoffe nach der Applikation metabolisiert werden müssen, bevor der Patient mit Licht geeigneter Wellenlänge bestrahlt werden kann. Die Wartezeit zwischen Applikation und Bestrahlung kann aus diesem Grunde mehrere Stunden betragen, womit sich die Compliance einer PDT mit ALA-Derivaten verschlechtert.

Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der ALA-Bioverfügbarkeit ist das Einsetzen von Grundlagen mit permeationsfördernden Stoffen [Casas et al., 2000]. In diesem Zusammenhang entstand in Anlehnung an das ibuprofenthaltige Fertigarzneimittel Dolgit® Mikrogel das so genannte Thermogel, eine halbfeste isotrope Zubereitung mit Ringing-Gel-Eigenschaften bestehend aus 20 % Poloxamer 407 (POX), 12,5 % Isopropanol (IPA), 12,5 % Dimethylisosorbid (DMIS), 5 % Miglyol® 840 (MIG) und 50 % Wasser (alle m/m). Es konnte gezeigt werden, dass diese Zubereitung deutlich überlegen bei der Permeation von ALA durch isoliertes humanes Stratum corneum (SC) gegenüber Arzneibuchgrundlagen wie der Wasserhaltigen Hydrophilen Salbe DAB und der Basiscreme DAC ist und dass die Permeationsverbesserung auf einen synergistischen Effekt der Bestandteile zurückgeführt werden kann [Grüning und Müller-Goymann, 2008]. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass eine Veränderung der Mischungsverhältnisse in der Grundrezeptur zu einem noch besseren Permeationsverhalten führte [Grüning, 2007].

Zielsetzung dieser Arbeit ist es, eine ausführliche physikochemische Charakterisierung des Thermogeles und von Zubereitungen mit den gleichen Inhaltsstoffen in anderen Mischungsverhältnissen durchzuführen. Hierfür soll ein pseudoternäres Mischungsdreieck, aus dem das Thermogel stammt, bestehend aus Wasser und festen Mischungsverhältnissen von POX/MIG (4:1) und IPA/DMIS (1:1)

aufgestellt werden. Auf diese Weise sollen halbfeste Zubereitungen mit geeigneten physikochemischen Eigenschaften für die dermale Applikation identifiziert werden. Die ausgewählten Grundlagen sollen genauer auf folgende Parameter untersucht werden:

- Rheologisches Verhalten
- Permeationseigenschaften
- Interaktionen mit SC
- Mikrostruktur

Hierfür werden sowohl wirkstofffreie, als auch ALA-haltige Zubereitungen berücksichtigt. Außerdem soll Lidocain als Modellarzneistoff dienen, um die Veränderungen zu untersuchen, die sich durch das Einarbeiten eines lipophilen Arzneistoffes in die Grundlage ergeben.

In einem zusätzlichen Kapitel werden verschiedene Chargen Poloxamer 407 untersucht, um die Qualität dieses Hilfsstoffes zu überprüfen, vor allem in Bezug auf die Übertragbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Hierfür werden verschiedene analytische Methoden angewendet, um sowohl die reinen Hilfsstoffe als auch Zubereitungen aus diesen zu untersuchen.

## 2 Allgemeiner Teil

### 2.1 Photodynamische Therapie (PDT)

Die Photodynamische Therapie (PDT) ist eine Methode, die zur Behandlung von verschiedenen Arten von Tumoren und Gewebeveränderungen angewendet wird. Dabei werden die betroffenen Stellen bzw. Organe mit Licht und einer lichtaktiven Substanz, einem sogenannten Photosensibilisator, behandelt. Topisch wird sie nicht nur zur Therapie von Hautkrebisformen und ihren Vorstufen (aktinische Keratose, Morbus Bowen, Basalzellkarzinom) eingesetzt, sondern auch für die Behandlung anderer Hautkrankheiten wie Psoriasis, Sklerodermie und Akne [Babilas et al., 2006].

#### 2.1.1 Geschichte

Die Anfänge der PDT können bis zur Antike zurückverfolgt werden, als die Ägypter vor über 4000 Jahren Vitiligo mit einer Kombination aus oral verabreichtem *Amni majus* und Sonnenlicht therapierten. Auch Griechen und Inder versuchten Psoriasis und Vitiligo zu heilen mit den Samen von *Psoralea coryfolia* zusammen mit Sonneneinstrahlung [Edelson, 1988]. Aus unbekannten Gründen wurde die PDT nicht weiter angewendet, so dass sie zu Beginn des 20. Jahrhunderts von dem dänischen Forscher Niels Finsen und von den deutschen Pharmakologen Hermann von Tappeiner und Oscar Raab neuentdeckt wurde [Daniell und Hill, 1991]. Raab (1900) bemerkte die photosensibilisierenden Eigenschaften von Acridinorange, als er die Effekte dieses Farbstoffes auf Protozoen studierte. Er stellte fest, dass die Toxizität nicht nur von der Konzentration des Farbstoffes, sondern auch von der Lichtintensität der Umgebung abhängig war. Mithilfe von Raabs Beobachtungen beschrieb von Tappeiner das Phänomen als sauerstoffabhängige Zerstörung von lebenden Zellen nach Photosensibilisierung mit Licht. Zusammen mit dem Dermatologen Jesionek behandelte er erfolgreich Patienten mit Lupus vulgaris, Syphilis und Hauttumoren mit einer topisch verabreichten 1-5 %igen Eosinlösung [von Tappeiner und Jesionek, 1903]. Außer Eosin kam zu dem Zeitpunkt der Farbstoff Erythrosin zum Einsatz, mit dem, ebenfalls topisch angewendet, verschiedene krankhafte Hautzustände wie Syphilis, Psoriasis und Hauttumore

behandelt wurden [Szeimies et al., 2001]. Aufgrund ihrer starken Nebenwirkungen wurde die Therapie mit diesen Wirkstoffen jedoch abgebrochen.

Schon seit 1913 wurde die systemische Gabe von Porphyrinen in der PDT wegen ihrer hohen Tumorgängigkeit, die zu einem starken photodynamischen Effekt nach Bestrahlung führte, ausgeübt [Meyer-Betz, 1913]. 1942 beobachteten Auler und Banzer, dass Hämatoporphyrin, ein durch die saure Hydrolyse von Hämoglobin entstehendes Produkt, nach parenteraler Gabe spezifisch in Tumorzellen aufgenommen wurde. Sie konnten sogar nekrotisches Gewebe nach der Bestrahlung mit einer potenten Quarzlampe nachweisen [Szeimies et al., 2001]. Trotzdem geriet die PDT in Vergessenheit, bis Mitte der 1970er Jahre eine PDT für die Behandlung von Hauttumoren etabliert werden konnte, indem Hämatoporphyrin-Derivate (HPD), die als Photosensibilisatoren der ersten Generation gelten, systemisch appliziert wurden [Dougherty et al., 1975]. Obwohl HPD eine hohe Tumorselektivität zeigten, resultierte als Nebenwirkung eine über mehrere Wochen anhaltende Photosensibilisierung [Schweitzer, 2001]. Außerdem konnten HPD aufgrund ihrer Größe nicht durch die Haut penetrieren und somit waren sie nicht topisch applizierbar. Nichtsdestotrotz sind HPD heute noch unter dem Handelsnamen Photofrin<sup>®</sup> für die Behandlung kleinzelliger endobronchialer Frühkarzinome zugelassen [Rote Liste, 2010]. Photofrin<sup>®</sup> enthält als Wirkstoff Porfimer-Na, das ein komplexes Gemisch aus Porphyrin-Monomeren und –Oligomeren darstellt. Aus diesem Gemisch werden im Gewebe die Dihämatoporphyrin-Ester (DHE), die die tumorselektive und die photosensibilisierende Wirkung vereinen, aufgenommen [Dougherty, 1987]. 1992 konnten Kennedy und Pottier erstmals die 5-Aminolävulinsäure als Präkursor von Protoporphyrin IX topisch anwenden und setzten damit einen Meilenstein in der Geschichte der PDT in der Dermatologie [Kennedy und Pottier, 1992].

### **2.1.2 Wirkmechanismus**

Der erste Schritt in der PDT ist die Applikation (systemisch oder topisch) des Photosensibilisators. Je nach Wirkstoff und Applikationsweg ergibt sich im Anschluss eine Wartezeit, die dem Wirkstoff erlaubt bis zum Wirkort zu gelangen. Danach erfolgt die Bestrahlung mit einer genauen Dosis Licht einer definierten Wellenlänge [Choudhary et al., 2009]. Die gewählte Wellenlänge richtet sich nach dem

Absorptionsspektrum der Porphyrine, wobei nicht am Absorptionsmaximum bei 405 nm, sondern bei 630 nm bestrahlt wird. Das längerwellige rote Licht kann tiefer in die Haut eindringen und somit tiefer liegende Tumore erreichen. Die Bestrahlung erfolgt so lange, bis die für die Aktivierung des Photosensibilisators benötigte Menge an Energie erreicht wird. Dabei nehmen ungepaarte Elektronen des Wirkstoffes diese auf, verändern ihren Energiezustand und werden hochreaktiv. Dadurch kommt es in einer photooxidativen Reaktion vom so genannten Typ I zu direkten Wechselwirkungen des angeregten Moleküls mit dem Gewebe, die über Redox- und Radikalkettenreaktionen Zellschäden verursachen. An dieser Stelle ist das Vorhandensein von Sauerstoff unerlässlich, denn in einer Reaktion vom Typ II entsteht durch Energieübertragung vom aktivierten Photosensibilisator auf zellulären molekularen Sauerstoff der radikalähnliche hochreaktive Singulett-Sauerstoff. Er ist zytotoxisch und oxidiert Aminosäuren, Nukleinsäuren sowie ungesättigte Fette und Fettsäuren, so dass es zum Zelltod kommt. Danach fällt der Photosensibilisator in seinen energetischen Grundzustand zurück, in dem er weitere Lichtquanten absorbieren kann [Foote, 1968].

### **2.1.3 Photosensibilisatoren und ihre Aufnahme ins Gewebe**

Die bevorzugte Aufnahme der Porphyrine in das erkrankte Gewebe konnte mit dem vermehrten Vorhandensein von LDL-Rezeptoren im proliferierenden Gewebe korreliert werden: LDL fungiert als Carrier für Hämatoporphyrin und fördert somit dessen Akkumulation im Gewebe [Polo et al., 2002]. Außerdem besitzt Tumorgewebe eine schwache Lymphdrainage, womit die verlängerte Retention in diesem Gewebe erklärt werden kann [Jori, 1990]. Weiterhin ist bekannt, dass die Tumorselektivität mit steigender Lipophilie des photosensibilisierenden Agens ansteigt [Chwilkowska et al., 2003].

Die Entwicklung von Photosensibilisatoren der zweiten Generation ermöglichte die Anregung der lichtaktiven Substanzen mit längerwelligem und damit tiefer ins Gewebe eindringendem Licht. Außerdem wurde die langanhaltende photosensibilisierende Wirkung nach systemischer Gabe auf eine Woche reduziert und die Kinetik der Wirkstoffe verbessert, so dass die Gabe des Photosensibilisators und die Bestrahlung zum gleichen Zeitpunkt erfolgen konnten [Boehncke und Kaufmann, 1996]. Außer Porphyrin-Derivaten, die am häufigsten in der PDT

verwendet werden, werden andere Stoffe, wie Chlorine (Derivate des Chlorophylls A), Phthalocyanine und Porphycene eingesetzt [Fritsch et al., 1998].

#### 2.1.4 Fertigarzneimittel für die PDT

Laut der Roten Liste 2010 sind für die Photodynamische Therapie in Deutschland vier Wirkstoffe (jedes für ein anderes Gebiet) zugelassen: Porfimer-Natrium, Verteporfin, Temoporfin und Methyl-(5-amino-4-oxopentanoat) (MAOP).

Porfimer-Natrium ist in Photofrin<sup>®</sup> enthalten und wurde in 2.1.1 besprochen. Verteporfin (Visudyne<sup>®</sup>) ist seit 2000 als Pulver zur Herstellung einer liposomalen Infusionslösung auf dem Markt und wird zur Behandlung der altersbedingten Makuladegeneration eingesetzt. Der Wirkstoff, auch bekannt als Benzoporphyrin-Derivat-Monosäure, ist eine 1:1 Mischung aus seinen zwei aktiven Isomeren. Nach der intravenösen Infusion wird die Läsion mit nichtthermischem Laserlicht ( $689 \pm 3$  nm) bestrahlt. Dabei werden pathologische Gefäßneubildungen in der Aderhaut des Auges verödet [Fachinformation Visudyne<sup>®</sup>, 2008].

Temoporfin (Foscan<sup>®</sup>) ist als fertige Injektionslösung für die palliative Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem Plattenepithelzellkarzinom im Hals- und Kopfbereich nach Versagen vorangegangener Therapien und bei ihrer Nichteignung für Strahlentherapie, operative Entfernung oder systemische Chemotherapie seit 2002 zugelassen [Rote Liste, 2010]. Foscan<sup>®</sup> wird durch rotes Laserlicht (652 nm) aktiviert, das von dem biolitec PDT Laser über einen flexiblen Microlens-Diffusor zielgenau abgegeben wird [biolitec AG, biological technology, 2005].

Ebenfalls seit 2002 ist Metvix<sup>®</sup> als Creme mit dem Wirkstoff MAOP, dem Methylester der 5-Aminolävulinsäure (ALA), in Kombination mit der LED-Rotlichtlampe Aktilite<sup>®</sup> zur Therapie von aktinischen Keratosen, oberflächlichen Basaliomen und Morbus Bowen zugelassen (Abbildung 2.1) [Fachinformation Metvix<sup>®</sup>, 2008].

In den Vereinigten Staaten findet man auf dem Arzneimittelmarkt Levulan<sup>®</sup> Kerastick<sup>®</sup>, ein stabförmiges Zweikammersystem, das aus zwei abgedichteten Glasampullen (eine mit 354 mg ALA-HCl als pulverförmige Substanz, eine mit dem Lösungsmittel auf Basis von Ethanol 48 %) besteht. Kurz vor der Anwendung werden beide sich im Stäbchen befindenden Ampullen gebrochen, indem Druck mit den Fingern ausgeübt wird. Hierbei entsteht 20 %ige Lösung von ALA, die zur topischen

Anwendung bei aktinischen Keratosen in Kombination mit Blaulicht zugelassen ist [DUSA Pharmaceuticals Inc., 2010].

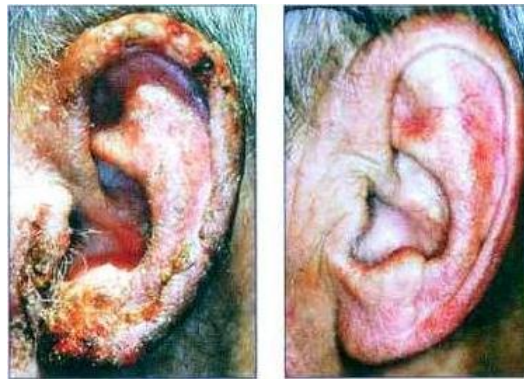


Abbildung 2.1: erfolgreiche Behandlung (links vorher, rechts nachher) eines Patienten mit aktinischer Keratose mit Metvix<sup>®</sup>.

## 2.2 5-Aminolävulinsäure (ALA)

Die 5-Aminolävulinsäure ( $\delta$ -Aminolävulinsäure, 5-Amino-4-oxopentansäure, ALA) ist eine Aminosäure aus der Gruppe der Ketocarbonsäuren, die physiologisch vorkommt und die Vorstufe des Häms in der Porphyrinsynthese darstellt. Sie ist damit gleichzeitig eine Vorstufe von Protoporphyrin IX (PpIX), das als Photosensibilisator in der PDT eingesetzt werden kann. Aus diesem Grund wird ALA ebenfalls in der PDT als Photosensibilisator eingesetzt. Ihre Synthese aus Glycin und SuccinylCoA in den Mitochondrien wird von dem Enzym 5-Aminolävulinat-Synthase (ALAS) katalysiert und stellt den ersten Schritt in der Biosynthese von Tetrapyrrolen und Porphyrinen dar. Diese Moleküle befinden sich in fast allen lebenden Zellen und sind die Vorstufen von lebenswichtigen Stoffen wie zum Beispiel Häm [Fukuda et al., 2005]. Die Häm-Synthese erfolgt über mehrere enzymatische Schritte, wobei insgesamt acht ALA-Moleküle am Endprodukt beteiligt sind (Abbildung 2.2). Hier entsteht aus zwei ALA Molekülen durch eine enzymatische Kondensation das Porphobilinogen (PBG), das wiederum mit drei anderen PBG-Molekülen mithilfe der PBG-Desaminase (PBGD), der Uroporphyrinogen-Cosynthase (URO III Cosynthase) und der Decarboxylase (URO III Decarboxylase) zum Coproporphyrinogen III (COPRO III) reagiert. Anschließend findet im Mitochondrium über zwei Oxidationsreaktionen die Synthese des für die PDT wichtigen PpIX statt [Fotinos et al., 2006]. Aus diesem entsteht durch

das Einfügen von Eisen mithilfe der Ferrochelatase das Häm, die prosthetische Gruppe von Proteinen wie Hämoglobin, Myoglobin und Cytochrom c, das über einen Rückkopplungsmechanismus die Synthese von ALA durch Hemmung der ALAS kontrolliert [Stryer, 1990]: je mehr Häm produziert wird, umso stärker wird die ALAS gehemmt. Durch eine externe Zufuhr von ALA kann dieser Rückkopplungsmechanismus umgangen werden, so dass es in den Zellen zur Akkumulation von PpIX kommt. Dies wird in der therapeutischen Anwendung von ALA für die PDT ausgenutzt.

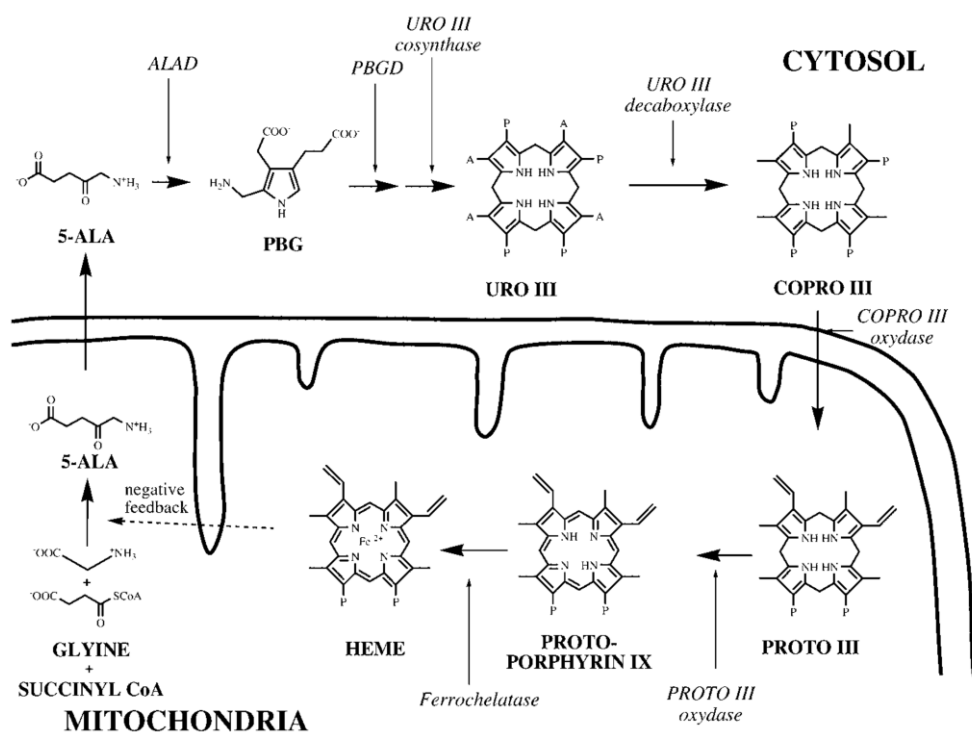


Abbildung 2.2: Häm-Biosynthese, Protoporphyrinstoffwechsel [Fotinos et al., 2006]  
5-Aminolävulinsäure (5-ALA), Porphobilinogen (PBG), Uroporphyrinogen (URO), Coproporphyrinogen (COPRO), Protoporphyrinogen (PROTO).

### 2.2.1 Topischer Einsatz von ALA in der PDT

Nachdem nach topischer Applikation von ALA eine Fluoreszenz von PpIX in Tumoren festgestellt werden konnte, wurde der Wirkstoff als Prodrug von PpIX in 20 %iger Konzentration als O/W-Emulsion in der PDT erfolgreich eingesetzt [Kennedy und Pottier, 1992]. Die Bestrahlung mit rotem Licht mit einer Wellenlänge



von 630 nm und einer Dosis von 150 J/cm<sup>2</sup> erfolgt 4 h nach der Applikation. Aufgrund der relativ hohen Dosis bzw. langen Bestrahlung können Schmerzen auftreten, die trotz der Verwendung von Lokalanästhetika präsent bleiben [Allison et al., 2004]. Die topische PDT mit ALA hat sich trotzdem bewährt. Seit Anfang der 1990er Jahre haben sich viele andere Forschungsgruppen diesem Wirkstoff zugewandt, denn die PDT mit ALA stellt eine der selektivsten Methoden zur Therapie von neoplastischen Krankheiten dar [Fotinos et al., 2006]. Es konnte zum Beispiel eine erfolgreiche Behandlung von Basalzellkarzinomen und Morbus Bowen [Morton et al., 2001], aber auch von schuppenartigen Hautkarzinomen und aktinischen Keratosen [Karrer et al., 1998] gezeigt werden. Ebenso konnten andere nicht-kreuzerogene Hautzustände wie Acne vulgaris und Psoriasis mit Erfolg therapiert werden [Mitra und Stables, 2006] und es konnte sogar gezeigt werden, dass ALA ein antiinfektives Potential gegenüber Staphylokokken- und Leishmania-Arten hat [O’Riordan et al., 2005]. Nach erfolgter PDT wurden außerdem sehr gute kosmetische Ergebnisse beobachtet. Die behandelten Hautregionen heilten narbenfrei ab und sahen jünger aus. Die beobachtete Hautverjüngung kam durch Stimulierung der Kollagenbildung zustande und ist vor allem in den USA unter dem Begriff „Photorejuvenation“ weit verbreitet [MacCormack, 2008].

### 2.2.2 Problematik

ALA bietet bei lokaler Anwendung neben einer hervorragenden Tumorselektivität, eine sehr niedrige systemische Toxizität und eine lokal begrenzte photosensibilisierende Wirkung der Haut 24-48 h nach der Applikation [Webber et al., 1997]. Wegen ihrer physikochemischen Eigenschaften ist ALA jedoch nicht einfach zu formulieren und daher nur in wenigen Zubereitungen auf dem Markt vertreten. Unter physiologischen Bedingungen kommen ALA-Moleküle als Zwitterione mit einer positiven Ladung in der Amino-Gruppe und einer negativen Ladung in der Carboxyl-Gruppe vor, so dass sich eine geringe Eindringtiefe und eine schlechte Permeation ergeben. Nach einer systemischen Applikation ist die Bioverfügbarkeit von ALA noch schlechter als nach einer dermalen. Mit Plasmahalbwertszeiten von 50 min nach intravenöser Applikation und von 45 min nach oraler Gabe [Dalton et al., 2002] bei einem Verteilungsvolumen von 8,3 l kann man davon ausgehen, dass ein großer

Anteil unverändert über die Niere aus dem Organismus ausgeschieden wird und dass ein weiterer Anteil direkt in der Leber metabolisiert wird.

Ein weiteres Problem neben der eingeschränkten Bioverfügbarkeit ist die chemische Stabilität von ALA, die von der Konzentration, vom pH-Wert und von der Zeit abhängig ist [Novo et al., 1996]. Es kommt zu verschiedenen Reaktionen, bei denen drei zyklische Kondensationsprodukte entstehen: Pseudoporphobilinogen (nur unter anaeroben Bedingungen), 2,5-( $\beta$ -Carboxyethyl)dihydropyrazin (CPHY), sowie vorwiegend unter Oxidation von CPHY entstehendes gelbgefärbtes 2,5-( $\beta$ -Carboxyethyl)pyrazin (CPY) (Abbildung 2.3) [Butler und George, 1992]. Für die Kondensation von zwei ALA-Molekülen müssen diese als Anion vorliegen, da nur so die Amino-Gruppe deprotoniert ist und zur Reaktion mit der Keto-Gruppe eines weiteren ALA-Moleküls fähig ist [Gadmar et al., 2002].

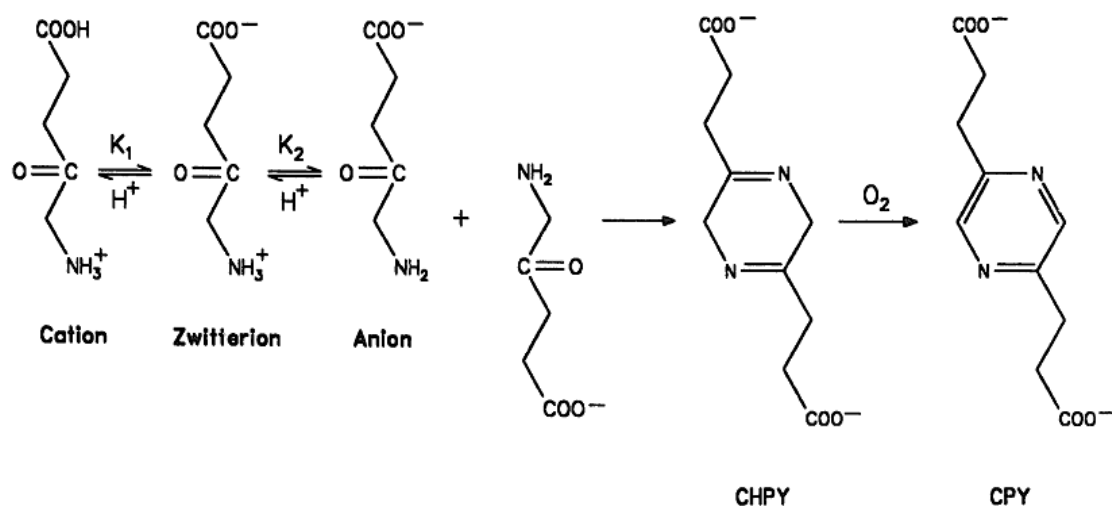


Abbildung 2.3: Zyklische Kondensationsprodukte von ALA [Novo et al. 1996].

Stabile ALA-Lösungen erhält man dementsprechend bei sauren pH-Werten, bei denen das Anion noch nicht vorhanden ist. Diese ist die meist genutzte Strategie, um die Instabilität von ALA zu verhindern, obwohl saure Zubereitungen Hautirritationen hervorrufen können. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine 1 %ige ALA-Lösung bei einem pH-Wert von 2,35 über einen Zeitraum von 37 Tagen stabil war [Elfsson et al., 1999]. Bei pH Werten zwischen 5 und 7,5 liegt ALA als Zwitterion vor, wobei bei pH 5,0 10 % der Moleküle als Kation und bei pH 7,4 10 % der Moleküle als

Anion vorliegen. Winkler (2005) konnte zeigen, dass bei Verwendung von Phosphatpuffer pH 5,0 aus der Pharmacopoea Helvetica die Stabilität von ALA über einen Versuchszeitraum von 30 h gegeben war. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung wasserfreier Systeme wie ein Gel aus Carbomer und wasserfreiem PEG 400 bzw. wasserfreiem Glycerol, das von McCarron et al. (2005) beschrieben wurde. In dieser Zubereitung blieben bei 5 °C und über einen Zeitraum von 6 Monaten 40,2 % ALA unverändert. Ein Pflaster aus Methylvinylether/Maleinsäureanhydrid-Copolymer konnte bei den gleichen Bedingungen bessere Ergebnisse zeigen: 86,2 % ALA waren über 6 Monate Lagerung stabil. Valenta (2005) konnte durch Verwenden eines kubischen Hydrogels aus Polyoxyethylen-5-cetyloleyether, Polyoxyethylen-10-cetyloleyether und Cetylstearyl-2-ethylhexanoat 100 % der eingesetzten Menge an ALA über den untersuchten Zeitraum von 90 Tagen nachweisen. Es scheint also auch möglich zu sein die chemische Stabilität von ALA im wässrigen System zu gewährleisten.

### **2.2.3 Verbesserung der Bioverfügbarkeit**

Die schon dargestellte schlechte Bioverfügbarkeit von ALA hat dazu geführt, dass verschiedene Strategien zu ihrer Verbesserung verfolgt wurden. Dazu zählen die chemische Modifikation des Wirkstoffes, die Optimierung der Formulierung in Bezug auf die Penetration/Permeation des Wirkstoffes, sowie die Anwendung physikalischer Methoden, die den Transport von ALA durch das SC erleichtern.

#### **2.2.3.1 Chemische Modifikationen**

Neben der Molekülgröße ist die Lipophilie eines Stoffes ein wichtiger Parameter für eine gute Diffusion durch das lipophile SC. Eine ganze Reihe von chemischen Modifikationen sind durchgeführt worden, um die Lipophilie von ALA zu steigern [Fotinos et al., 2006]. Ester, die durch die Reaktion von Alkoholen mit der Carbonsäure-Funktion von ALA synthetisch hergestellt werden, sind die meist untersuchten Verbindungen. De Rosa et al. (2003) konnten zeigen, dass der Verteilungskoeffizient einer homologen Reihe von ALA-Estern mit steigender Kettenlänge ansteigt. Aus diesem Grund kann man sich eine bessere Permeation eines länger-kettigen ALA-Esters verglichen zu ALA vorstellen. Es wurde deswegen

vorgeschlagen, dass ALA-Ester in niedrigeren Konzentrationen und mit kürzeren Applikationszeiten angewendet werden können [Lopez et al., 2004]. Dies konnte in mehreren In-vitro-Studien nachgewiesen werden, die über einen Zeitraum von ca. 30 h liefen. Die gleichen Untersuchungen ließen allerdings keine Unterschiede erkennen, wenn die Permeationsuntersuchungen an die therapeutischen Einwirkungsauern von 4 bis 6 h angepasst wurden [van den Akker et al., 2003]. In-vivo-Studien bei Menschen [Gerscher et al., 2000; Gerscher et al., 2001; Peng et al., 2001] oder mit Mäusen [Peng et al., 1996; Juzeniene et al., 2002; Moan et al., 2003] zeigten nach topischer Applikation, dass die PpIX-Produktion aus ALA-Estern im Gegensatz zu der aus ALA von einer langen Lag-Zeit begleitet wurde. Erst danach wurden aus ALA-Estern höhere Werte an PpIX als aus ALA erreicht. Die Lag-Zeit konnte mit der Akkumulation im SC für lipophilere Substanzen begründet werden. Außerdem könnte es sein, dass die Freisetzung der ALA-Ester aus dem Vehikel langsamer war, womit die Lag-Zeit und die damit verbundene verzögerte Permeation zu erklären wäre. Man kann also sagen, dass die In-vivo-Untersuchungen von ALA-Estern zwar noch keine deutliche Überlegenheit zeigen konnten, dass aber eine mindestens genauso gute Wirkung wie bei ALA erreicht werden konnte. Mit dem Methylester von ALA konnte eine erfolgreiche PDT von nodularen Basalzellkarzinomen, die mit einer ALA-Therapie nicht zufriedenstellend behandelt werden konnten [Pearse, 2002; Zeitouni et al., 2003], durchgeführt werden [Szeimies et al., 2002; Yamauchi et al., 2002]. Dieser Wirkstoff ist wie in Kapitel 2.1.4 beschrieben zugelassen für die Behandlung von aktinischen Keratosen, oberflächlichen Basaliomen und Morbus Bowen.

### **2.2.3.2 Optimierung der Formulierung**

Bei der Optimierung der Formulierung in Bezug auf eine verbesserte Penetration bzw. Permeation von ALA durch die Haut spielt die Anwendung von Penetrationsverbesserern eine große Rolle. In einigen Publikationen wurde das häufig als Penetrationsförderer eingesetzte Dimethylsulfoxid (DMSO) angewendet [Harth et al., 1998; Casas et al., 2000; Soler et al., 2001], das zur Vermeidung von Hautirritationen nur in Konzentrationen bis 10 % eingesetzt werden sollte [Iliev et al., 1997]. Trotzdem wurde DMSO in 20 %iger Konzentration zu einer O/W Emulsion gegeben, die 10 % ALA enthielt, womit eine Verbesserung des ALA-Fluxes

beobachtet wurde [De Rosa et al., 2000]. Glycerolmonooleat, ein Ester der Ölsäure und ein weiterer häufig angewendeter Penetrationsförderer, wurde in bis zu 20 %iger Konzentration untersucht [Steluti et al., 2001]. Es wurde gezeigt, dass in vitro die Permeation und Retention von ALA verbessert wurde. Winkler (2005) untersuchte Dolgit® Mikrogel, ein Fertigarzneimittel mit Ibuprofen als Wirkstoff und unter anderem Isopropanol als Penetrationsverbesserer und konnte von einer deutlichen Erhöhung des ALA-Fluxes verglichen zu anderen halbfesten Zubereitungen wie Excipial® Creme berichten. Eine ibuprofenfreie Zubereitung mit denselben Hilfsstoffen wie das Dolgit® Mikrogel setzte Grüning (2008) ein und zeigte eine bemerkenswerte Verbesserung des ALA-Permeationsfluxes gegenüber der Wasserhaltigen Hydrophilen Salbe des DAB und der Basiscreme DAC. Grüning führte diese Verbesserung auf einen synergistischen Effekt der enthaltenen Bestandteile zurück [Grüning, 2007].

Eine andere Strategie zur Permeationsverbesserung von geladenen Wirkstoffen durch die Haut ist die Ausbildung von nicht geladenen Komplexen. Hierfür wird die Ladung des Wirkstoffes durch einen Zusatz ausgeglichen, so dass der entstandene ungeladene Komplex besser durch das SC difundieren kann [Donnelly et al., 2005]. Auner et al. (2003) setzten lipophile Gegenionen in Kombination mit Penetrationsförderern ein, um die Permeation von ALA durch Schweinehaut zu verbessern. Sie konnten eine Permeationssteigerung bei pH 4,0 und pH 7,0 mit anionischen bzw. kationischen Gegenionen nachweisen und schlugen die Kombination von 6-Ketocholestanol und Cetylpyridiniumchlorid als potentielle Lösung zur Penetrationsverbesserung von ALA vor. Ferner wurden Liposomen zur Permeationsverbesserung von ALA getestet. Die Inkorporation von ALA in Liposomen zeigte jedoch keine Verbesserung der Bildung von PpIX. Die besten Ergebnisse konnten mit einer salinen ALA-Lösung mit einem Zusatz von DMSO erreicht werden [Casas et al., 2000; Casas et al., 2002].

### **2.2.3.3 Physikalische Methoden**

Eine der angewendeten physikalischen Methoden zur Verbesserung der ALA-Bioverfügbarkeit ist das so genannte Tape Stripping, bei dem mithilfe eines adhäsiven Filmes (z.B. TESA-Film) sukzessiv Schichten des SC entfernt werden. Diese Methode erleichtert den Transport von Wirkstoffen durch die Haut dadurch,

dass die Dicke der Haut abnimmt und somit die Barrierefunktion geringer wird. De Rosa et al. (2003) konnten zeigen, dass große Mengen ALA und ALA-Ester im SC gespeichert werden. Sie konnten nachweisen, dass das Entfernen von SC-Schichten mittels Tape Stripping einen erheblichen Vorteil für die Permeation mit sich bringt. Am Beispiel von ALA-Hexylester (HALA) wiesen Van den Akker et al. (2000) den gleichen Zusammenhang nach. Aufgrund der lipophilen Eigenschaften von HALA verblieben bei einer nicht beeinflussten Permeation große Mengen HALA im SC und konnten das Zielgewebe nicht erreichen. Nach der Durchführung eines Tape Strippings war die permeierte Menge an HALA viel höher als zuvor.

Mittels Iontophorese, einem medizinischen Verfahren zur Resorption von Arzneistoffen durch die Haut unter Anwendung eines schwachen elektrischen Stromes, wurde ebenfalls versucht, die Eindringtiefe von ALA und ihre Konzentration im Gewebe zu erhöhen sowie die Applikationszeit zu verkürzen [Rhodes et al., 1997; van den Akker et al., 2000; Star et al., 2002]. Es wurde gezeigt, dass unabhängig von der verwendeten Grundlage (verschiedene flüssige und halbfeste Systeme), aus der ALA freigesetzt wurde, die Iontophorese überlegen war und dass mit dieser Methode innerhalb von 10 min die gleiche Menge an ALA durch die Haut transportiert werden konnte, wie nach mehreren Stunden passiver Diffusion [Lopez et al., 2001]. ALA-Ester konnten auch mithilfe dieser Methode durch die Haut transportiert werden, da sie ebenfalls eine Ladung im Molekül tragen. Die gleichen Autoren konnten eine verglichen zu ALA 50fach höhere Permeation für den ALA-Methylester erreichen [Lopez et al., 2003]. Sie stellten fest, dass die Permeationsverbesserung umso kleiner war, je höher die Kettenlänge des ALA-Esters war.

Als weitere physikalische Methode zur Verbesserung der Permeation gilt die Veränderung der Hauttemperatur. Durch das Anwenden von Zubereitungen mit okklusiven Eigenschaften kann die Temperatur der Hautoberfläche von 32 °C bis auf 37 °C erhöht werden. Van den Akker et al. (2004) verglichen die Penetration von ALA durch Mäusehaut bei normaler (32 °C) und bei erhöhter (37 °C) Temperatur und stellten eine signifikante Erhöhung der ALA-Penetration fest, wenn diese auf 37 °C konstant gehalten wurde.

Schließlich wurde der Einsatz photomechanischer Wellen als penetrationsfördernd beschrieben. Diese scheinen in der Lage zu sein mechanisch mit Hautzellen zu wechselwirken, wodurch der Transport von Molekülen durch die Haut gefördert wird.

Lee et al. (1999) zeigten, dass eine einzige photomechanische Kompressionswelle (110 nsec) in der Lage war, die ALA-Permeation durch menschliche Haut in vivo um 680 % zu erhöhen.

## **2.3 Poloxamer 407 (POX)**

### **2.3.1 Polymere für die dermale Applikation**

In der Dermopharmazie wird eine Vielzahl an Polymeren angewendet wie Cellulosederivate und Polyacrylate als klassische Beispiele oder Chitosan-EDTA und Carrageenane als innovative Polymere. Dabei agieren Polymere hauptsächlich als Gelbildner, wobei sie auch in Cremes und Emulsionen als Stabilisator bzw. Konsistenzgeber eingesetzt werden. Weiterhin können Polymere die Matrix eines transdermalen therapeutischen Systems darstellen und in manchen Fällen sogar als Penetrationenhancer fungieren [Valenta und Auner, 2004]. Die Vielzahl an Polymeren ermöglicht die Entwicklung von Vehikeln mit sehr unterschiedlichen Eigenschaften. O/W-Emulsionen, die mit Polymeren stabilisiert werden, haben zum Beispiel den Vorteil gegenüber klassischen Emulsionen, dass sie sich samtartig und geschmeidig anfühlen [Anon, 2002]. Ein wesentlicher Vorteil von Polymeren in der dermalen Applikation ist, dass mit ihnen eine kontrollierte Freisetzung realisierbar ist. So konnte zum Beispiel in einer Vergleichsstudie eine Freisetzung nach einer Wurzel-t-Kinetik aus einem Carbopol®- und einem Poloxamer-Gel beobachtet werden [Yu et al., 1998]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass mit Polymeren wie Pemulen® (hydrophobisierte Acrylsäure-Copolymere) stabile, temperaturunabhängige und gleichzeitig niedrigviskose Emulsionen erzeugt werden können, was mit klassischen Emulgatoren nicht machbar ist [Savic et al., 2002]. Innovative Polymere, wie Chitosan-EDTA, sind unempfindlich gegenüber Zusätzen wie polyvalenten Kationen oder Ethanol und zeigen zusätzlich eine hohe antimikrobielle Aktivität verglichen mit anderen Hydrogelbildnern [Valenta et al., 1998]. Chitosan zeigte weiterhin eine Verbesserung der Penetration durch die Haut [Junginger und Verhoef, 1998], die mit einer Interaktion von Bestandteilen aus dem SC und dem Polymer und der damit verbundenen Erhöhung der Löslichkeit des Arzneistoffes in der Haut erklärt wurde [Cerchiara et al., 2002]. Da die Anwesenheit von tight junctions in der Haut

nachgewiesen werden konnte [Malminen et al., 2003], könnte es sein, dass Chitosan mit diesen in der Weise interagiert, dass die Penetration erhöht wird. Ebenso wird von einer permeationsfördernden Wirkung von Polyacrylaten berichtet, die durch Interaktionen mit den tight junctions begründet wird [Junginger und Verhoef, 1998]. Bei zwei neuentwickelten Polymeren, die durch die Reaktion von Poly(4-vinylpyridin) und Hexadecylbromid bzw. durch die Polymerisation von p-Vinyl-benzyltrimethylammoniumchlorid synthetisiert wurden, wurden penetrationsfördernde Eigenschaften beobachtet, die über eine Interaktion mit Proteinen und Lipiden der Haut mittels DSC nachgewiesen wurden [Aoyagi et al., 1990; Aoyagi et al., 1991].

### 2.3.2 Poloxamere

Poloxamere (auch bekannt als Pluronic<sup>®</sup>, Synperonic<sup>®</sup> oder Tetronics<sup>®</sup>) wurden in den 1950er Jahren eingeführt und werden seitdem in der Herstellung von Drug Delivery Systemen eingesetzt [Kabanov und Alakhov, 2002], da sie die Löslichkeit, die Stabilität und die Verweildauer von Arzneistoffen erhöhen bzw. verbessern können. In den letzten Jahrzehnten wurden sie auch als Gene Delivery Systeme eingesetzt [Kabanov et al., 2005]. Dabei konnte gezeigt werden, dass sie die Genexpression fördern und dass sie als sogenannte biologische Adjuvantien Signalwege, wie den von NF- $\kappa$ B, aktivieren können.

Poloxamere bestehen aus Ethylenoxid (EO) und Propylenoxid (PO) Einheiten, die durch sequentielle Polymerisation in Anwesenheit von Natrium- oder Kaliumhydroxid hergestellt werden [Kabanov et al., 2002]. Nach diesem Prozess erhält man Produkte mit einem Aufbau, der dieser Substanzklasse die Bezeichnung als Block(co)polymer gibt und ihr die oberflächenaktiven Eigenschaften, wegen der Poloxamere als Emulgatoren und Solubilisatoren eingesetzt werden, verleiht (Abbildung 2.4). Je nach Polymerisationsgrad ergeben sich zwar immer amphiphile aber in Bezug auf Ihre Konsistenz sehr unterschiedliche Substanzen (von Flüssigkeiten über Pasten bis zu Feststoffen). Weitere Eigenschaften wie Molekülgröße oder Hydrophilie/Lipophilie (HLB-Wert) hängen ebenfalls stark von den Werten für n und m ab [Dumortier et al., 2006]. Außerdem ergibt sich die Nomenklatur der Poloxamere aus den Werten für n und m: die zwei ersten Ziffern multipliziert mit 100 ergeben in etwa das Molekulargewicht der PO-Fraktion und die letzte Ziffer multipliziert mit 10 ergibt den prozentuellen Anteil an EO [Martindale 2009]. Weiterhin sind Poloxamere dafür



bekannt mit Wasser klare thermoreversible Gele ausbilden zu können [Gilbert et al., 1986; Kim et al., 2000]. Diese Tatsache macht Poloxamere interessant für die pharmazeutische Forschung, da Formulierungen entwickelt werden können, die nach der Applikation im flüssigen Zustand bei Körpertemperatur gelieren können.

Poloxamer 407 (POX) ist unter den Namen Pluronic® F 127, Synperonic® PE/F 127 und Lutrol® F 127 bekannt und stellt einen geruchs- und geschmacklosen Feststoff (je nach Hersteller eine grobkörnige Substanz oder Plättchen) dar. Es hat ein Molekulargewicht von 12600 g/mol (9840-14600 g/mol) [Takats et al., 2001] und besitzt oberflächenaktive Eigenschaften (HLB-Wert 22 bei 22 °C) [Moghimi und Hunter, 2000]. Außerdem handelt es sich aus toxikologischer Sicht um den besten Vertreter der Substanzklasse der Poloxamere [Schmolka, 1972; Gilbert et al., 1986]. Aus diesen Gründen wird POX vielfältig in pharmazeutischen Zubereitungen eingesetzt [Escobar-Chávez et al., 2006]. In Abbildung 2.4 ist die chemische Strukturformel von POX dargestellt. Mit  $n = 95-105$  und  $m = 54-60$  ist das molare Verhältnis von EO zu PO etwa 3,5.

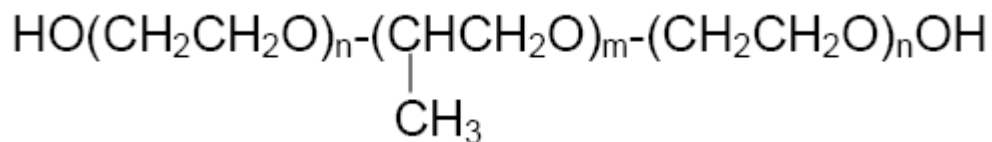


Abbildung 2.4: Chemische Strukturformel von Poloxamer 407.

### 2.3.3 Thermoreversible Eigenschaften

POX-Moleküle existieren bei sehr niedrigen Konzentrationen als Monomere in Lösung [Mortensen, 1996]. Ab einer Konzentration von  $10^{-4}$  -  $10^{-5}$  % (m/m) entstehen sphärische POX-Mizellen, die aus einem dehydrierten PP-Kern und einer gequollenen PE-Hülle bestehen [Juhasz et al., 1989]. Die Mizellisierung gilt als erster Schritt des Gelierungsprozesses [Cabana et al., 1997], da eine Erhöhung der POX-Konzentration zu einem sehr dicht gepackten und geordneten Netzwerk führt, das als Gelgerüst fungiert [Wanka et al., 1990]

Das Phänomen der Gelierung ist jedoch nicht nur von der POX-Konzentration, sondern auch von der Temperatur abhängig (Abbildung 2.5) [Artzner et al., 2007].

Bei niedrigen Temperaturen sind POX-Moleküle vollständig hydratisiert und somit in Lösung. Eine Temperaturerhöhung verändert die Löslichkeiten der Blöcke innerhalb der POX-Moleküle unterschiedlich stark. Während sich die Löslichkeit der PE-Moleküle kaum verändert, kommt es bei den hydrophoben PP-Molekülen zur Abschwächung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen ihnen und den Wassermolekülen, so dass es zur Dehydratation der PP-Moleküle kommt [Mortensen und Pedersen, 1993]. Auf diese Weise interagieren PP-Moleküle stärker miteinander und bilden so den hydrophoben Kern der Mizellen aus, der von der hydrophilen PE-Hülle umgeben ist [Cabana et al., 1997]. Durch eine weitere Temperaturerhöhung entstehen mehr Mizellen, die wie oben beschrieben ein Gelgerüst ausbilden.

Das Gelierungsverhalten von POX-Systemen ist vollständig thermoreversibel und kann durch einen Thermogelierungspunkt (TGP) charakterisiert werden. Der TGP gibt die Temperatur an, bei der ein flüssiges System halbfest wird. Die Thermoreversibilität von POX-Systemen kann für die Zubereitung von Gelen ausgenutzt werden. Die gewünschte Menge an POX wird dafür mit auf 4-5 °C abgekühltem Wasser gemischt und gerührt, bis eine klare homogene Lösung entsteht. Beim Erreichen von Raumtemperatur entstehen klare halbfeste Gele, die direkt angewendet werden können [Schmolka, 1972].

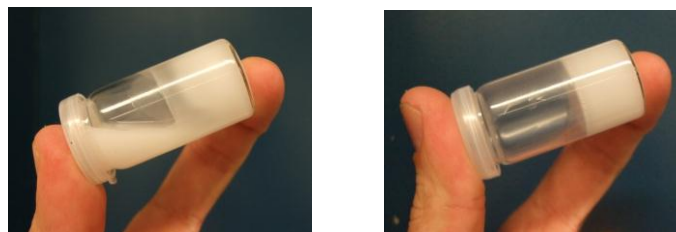


Abbildung 2.5: Thermoreversible Gelierung von Poloxamer 407 Systemen am Beispiel von POX2525 (links: ca. 4 °C, rechts: Raumtemperatur).

### 2.3.4 Flüssigkristalline Strukturen

Der Begriff „Flüssigkristall“ wird für Systeme benutzt, die sowohl Eigenschaften von Kristallen aufweisen (z.B. hohe Ordnung, Anisotropie), als auch Merkmale von Flüssigkeiten besitzen (z.B. Fließfähigkeit) [Bauer et al., 2006]. Die Flüssigkristalle lassen sich in zwei Gruppen einteilen: thermotrope und lyotrope Flüssigkristalle. Um thermotrope Flüssigkristalle handelt es sich, wenn der flüssigkristalline Zustand temperaturabhängig ist (z.B. Cholesterolderivate). Bei den lyotropen Flüssigkristallen ist die Ausbildung der Strukturen abhängig von der Zugabe eines Lösungsmittels. Die unterschiedlichen lyotropen Flüssigkristalle können aufgrund ihrer Eigenschaften identifiziert und in drei Gruppen eingeteilt werden (Abbildung 2.6).

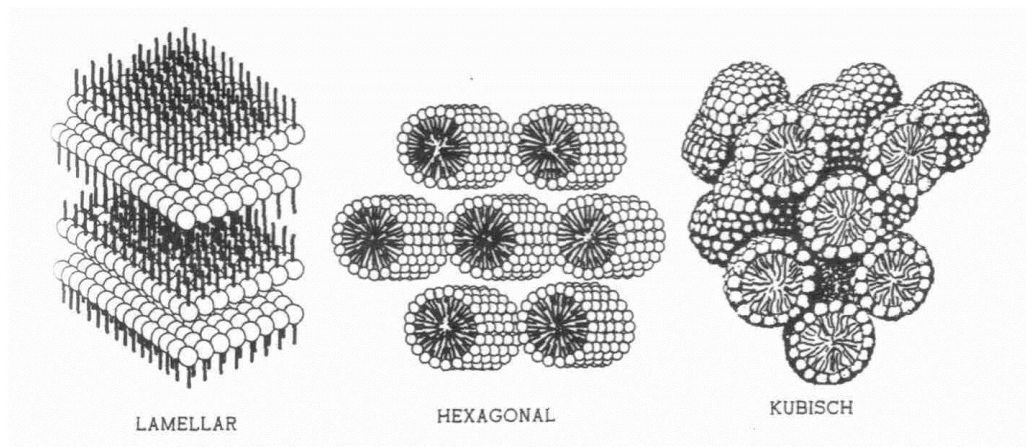


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung flüssigkristalliner Strukturen [Orecchioni et al., 1984].

Lamellare Flüssigkristalle zeigen eine Periodizität in eine Raumrichtung. Es handelt sich um parallele Ebenen, in denen die Tensidmoleküle freie Beweglichkeit haben. Dadurch, dass die Ebenen sich leicht gegeneinander verschieben lassen, resultiert eine relativ niedrige Viskosität [Tiddy, 1980]. Unter dem Polarisationsmikroskop erkennt man Malteserkreuze und oily streaks [Rosevear, 1954]. Hexagonale Flüssigkristalle zeichnen sich durch die Ausbildung parallel ausgerichteter Röhren aus und zeigen eine Periodizität in zwei Raumrichtungen. Die Aggregate lassen sich nur in eine Raumrichtung verschieben, wodurch die Viskosität höher ist als bei lamellaren Systemen [Tiddy, 1980]. Unter dem Polarisationsmikroskop erkennt man sie anhand flächiger Texturen [Rosevear, 1954]. Kubische Flüssigkristalle sind in der

Regel hochviskos, aufgrund der Ordnung in alle drei Raumrichtungen [Tiddy, 1980]. Unter dem Polarisationsmikroskop erkennt man ein einfarbiges Bild ohne Texturen. Dies kann mit der vorhandenen Isotropie begründet werden. Kubische Flüssigkristalle werden auch als Brumm- oder Ringing-Gele bezeichnet, da sie bei mechanischer Anregung in hörbare Resonanz treten. Bei kubischen Systemen können sich die Tensidmoleküle unterschiedlich anordnen.

Eine gängige Methode, um flüssigkristalline Strukturen zu untersuchen, ist die Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXD). Zu Röntgenbeugungseffekten kommt es, wenn Röntgenstrahlen auf periodisch aufgebaute Strukturen auftreffen. Dies passiert zum Beispiel in echten Kristallgittern, aber auch in Flüssigkristallen, die eine Periodizität in mindestens eine Raumrichtung aufweisen (s.o.). Röntgenstrahlen werden an Flächen unterschiedlicher Elektronendichte teilweise reflektiert und teilweise durchgelassen. Folgt eine zweite Fläche im Abstand  $d$ , kann der Strahl auch hier reflektiert werden, wobei der zweite Strahl eine längere Strecke zurückgelegt hat als der erste. Entspricht diese Wegstrecke einem ganzzahligen Vielfachen der Wellenlänge  $\lambda$  der eingesetzten Röntgenstrahlung, überlagern sich beide Strahlen positiv, so dass es zu einer Intensitätsverstärkung kommt, die im Detektor in Form von Interferenzpeaks sichtbar werden [Harms, 2003]. Je nach Art der flüssigkristallinen Struktur ergeben sich unterschiedliche Interferenzfolgen, mit der sie unterschieden werden können (Tabelle 2.1). Bei kubischen Systemen gibt es unterschiedliche Anordnungen, so dass sich für diese auch unterschiedliche Interferenzfolgen ergeben.

Tabelle 2.1: Charakteristische Interferenzfolgen lyotroper flüssigkristalliner Strukturen.

Art der Flüssigkristalle	Interferenzfolge	Literaturquelle
lamellar	$1 : \frac{1}{2} : \frac{1}{3} : \frac{1}{4} : \frac{1}{5}$	Luzzati et al. (1960)
hexagonal	$1 : \frac{1}{\sqrt{3}} : \frac{1}{\sqrt{4}} : \frac{1}{\sqrt{7}} : \frac{1}{\sqrt{12}}$	Luzzati et al. (1960)
kubisch	$1 : \sqrt{\frac{3}{4}} : \sqrt{\frac{3}{8}} : \sqrt{\frac{3}{11}}$ $1 : \frac{1}{\sqrt{4}} : \frac{1}{\sqrt{5}} : \frac{1}{\sqrt{6}} : \frac{1}{\sqrt{8}} : \frac{1}{\sqrt{10}}$ $1 : \frac{1}{\sqrt{2}} : \frac{1}{\sqrt{3}} : \frac{1}{\sqrt{4}} : \frac{1}{\sqrt{6}} : \frac{1}{\sqrt{8}} : \frac{1}{\sqrt{10}}$	Luzzati et al. (1960) Fontell et al. (1968) Luzzati et al. (1960)

Flüssigkristalline Strukturen erlauben die Inkorporierung von Wirkstoffen verschiedener Polarität und deren kontrollierte Freisetzung [Müller-Goymann, 2004]. Aus diesem Grund ist es interessant, ob Poloxamere solche Strukturen ausbilden. Poloxamere bilden in Wasser, wie in 2.3.3 beschrieben, ein Gel aus, das aus einem geordneten Netzwerk von Mizellen besteht. Liu und Chu (2000) konnten mithilfe der Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXD) nachweisen, dass solche Gele mit einem POX-Gehalt von 20 bis 40 % eine kubisch-flächenzentrierte Struktur (face-centered cubic) zeigen, während bei höheren POX-Konzentrationen (50 %) eine kubisch-raumzentrierte (body-centered cubic) Struktur zu finden ist. Mortensen (1996) untersuchte die Auswirkungen von Konzentrations- und Temperaturveränderungen auf das System Pluronic P85 in D<sub>2</sub>O und fand heraus, dass je nach Konzentration und Temperatur nicht nur kubische sondern auch hexagonale und lamellare Phasen ausgebildet wurden. Ivanova et al. (2002) untersuchten den Einfluss von polaren pharmazeutischen Hilfsstoffen (PEG400, Glycerol, Propylenglykol, Ethanol und Glucose) auf POX-Gele in Wasser. Die Einarbeitung der Hilfsstoffe veränderte zwar die Größe der Flächen, die von den verschiedenen Strukturen in einem ternären Phasendiagramm beansprucht wurden, nicht aber die Art der gebildeten Strukturen: in allen fünf Fällen wurden bei POX-Konzentrationen kleiner als 20 % klare, isotrope Lösungen, bei mittleren Konzentrationen (ca. 20-60 %) kubische Phasen aus geordneten sphärischen Mizellen und bei höheren Konzentrationen (ca. 65-75 %) hexagonale Strukturen aus zylindrischen Mizellen gefunden. Holmqvist et al. (1998) untersuchten die strukturellen Auswirkungen, die sich durch Zugabe von lipophilen Substanzen (Butylacetat und Butanol) auf das System POX/Wasser ergaben. Bis zu einer Konzentration von ca. 10 % an lipophiler Komponente konnten ebenfalls eine mizellare Lösung und eine kubische Phase nachgewiesen werden. Die hexagonale Phase konnte bis zu 20 % Butanol und bis zu 30 % Butylacetat aufnehmen. Zusätzlich wurde eine lamellare Phase bei 45 – 60 % POX und 25 – 40 % Butanol bzw. bei 10-30 % POX und 25-45 % Butylacetat beobachtet.

## **2.3.5 Einsatz in der Pharmazie**

### **2.3.5.1 Anwendung als Gelbildner**

Wie oben erwähnt wird POX aufgrund der niedrigen Toxizität und der thermoreversiblen Gelierung für die Applikation verschiedenster Wirkstoffe in vielfältige Zubereitungen eingearbeitet. Hauptsächlich wird POX als Hydrogelbildner in Zubereitungen für die dermale Applikation eingesetzt. In der Literatur konnten viele Studien gefunden werden, die sich mit der topischen Gabe von NSAID (non steroidal anti inflammatory drugs) beschäftigten [Miyazaki et al., 1995; El-Kattan et al., 2000; Shin et al., 2001; Escobar-Chavez et al., 2005]. Dabei wurden die leichte Herstellung von POX-Gelen und deren einfache Applikation hervorgehoben. Außerdem konnten auch relativ kleine Mengen an Wirkstoff eingearbeitet werden, obwohl in manchen Fällen der Zusatz penetrationsfördernder Substanzen nötig war, um genügend Wirkstoff durch die Haut zu schleusen.

POX wurde aber auch an anderen Applikationsorten getestet. Es wurden zum Beispiel ein bioadhesives Gel in Kombination mit Carbopol® 934 und Penetrationsverbesserern für die buccale Applikation von Triamcinolonacetonid [Shin und Kim, 2000], ein rektales Gel in Kombination mit Hydroxypropylmethylcellulose für die Applikation von Chinin bei Kindern in der Malaria-Therapie [Fawaz et al., 2004] und ein liposomales Gel für die intramuskuläre Applikation von Ibuprofen [Paavola et al., 2000] beschrieben. Ebenso konnten transdermale Anwendungen mit systemischer Wirkung gefunden werden, wie die iontophoretische Gabe von Insulin [Pillai und Panchagnula, 2003] oder von Arginin-Vasopressin [Nair und Panchagnula, 2003].

### **2.3.5.2 Solubilisierende Eigenschaften**

Aufgrund der Fähigkeit zur Mizellbildung können hydrophobe Substanzen in den Kern der POX-Mizellen eingebaut werden. Auf diesem Wege konnte die Löslichkeit von Piroxicam in Wasser durch eine Zugabe von 22,5 % POX um das 11-fache erhöht werden. Dabei fand eine Interaktion zwischen den Hydroxyl-Gruppen von POX und der Imino-Gruppe von Piroxicam statt [Shin und Cho, 1997]. Die Löslichkeit

von Nifedipin konnte durch eine Zugabe von 4 % POX sogar um das 27-fache erhöht werden. Diese starke Verbesserung der Löslichkeit konnte mittels IR-Spektroskopie auf intermolekulare Wasserstoffbrücken zwischen Nifedipin und POX zurückgeführt werden [Chutimaworapan et al., 2000]. Außerdem ließen sich schwerlösliche Substanzen wie Indometacin für die Applikation am Auge [Dimitrova et al., 2000] oder Insulin für die parenterale Gabe solubilisieren [Barichello et al., 1999].

### **2.3.5.3 Stabilisierende Eigenschaften**

Eine stabilisierende Wirkung von POX auf empfindliche Arzneistoffe wie Proteine wurde in der Literatur mehrfach beschrieben. POX ist in der Lage die dreidimensionale Struktur von Proteinen zu schützen und sogar die enzymatische Aktivität zu erhöhen [Wang und Johnston, 1993]. Eine stabilisierende Wirkung wurde aber auch in Zusammenhang mit kolloidalen Arzneiformen nachgewiesen. So konnten proteingeladene Mikropartikel stabilisiert werden, indem die Hydrophilie der Matrix gesteigert wurde, so dass die Aggregation zwischen den Partikeln vermindert wurde [Lin und Huang, 2001]. Auch Liposomen konnten sterisch stabilisiert werden, wodurch ihre Verweildauer im Blut erhöht wurde. Hierfür wurde POX entweder zu den Lipiden während der Herstellung oder zu den fertigen Liposomen zugegeben [Woodle et al., 1992]. POX konnte auch eine thermoreversible W/O/W-Emulsion stabilisieren, die die vollständige Freisetzung des eingeschlossenen Markers bei Körpertemperatur erlaubte [Olivieri et al., 2003].

### **2.3.5.4 Bioadhäsive Eigenschaften**

Aufgrund der thermoreversiblen Eigenschaften wird POX zur Verbesserung der Bioadhäsion eingesetzt. Diese ist umso größer, je höher die POX-Konzentration bzw. die Temperatur ist. Sie kann aber durch Zusätze anderer Hilfsstoffe oder Wirkstoffe in beide Richtungen modifiziert werden. So wurde sie zum Beispiel durch einen Zusatz von Ethanol, Diclofenac und Propylenglykol erniedrigt und durch einen Zusatz von Natriumchlorid, Natriumhydrogenphosphat und Glycerol erhöht [Choi et al, 1999; Yong et al, 2001]. Der Einfluss auf die physikochemischen Eigenschaften schien mit der Fähigkeit Bindungen einzugehen zu korrelieren. In diesem Zusammenhang können Zusätze gezielt eingearbeitet werden, um die Verweildauer am

Applikationsort zu verlängern. Dies ist für die rektale, kutane und ophthalmische Applikation von großer Bedeutung.

### **2.3.5.5 Kontrollierte Freisetzung**

Ein weiterer Vorteil von POX ist, dass es in der Lage ist die Freisetzung von inkorporierten Wirkstoffen zu kontrollieren. Fang et al. (2002) konnten nachweisen, dass Hydrogele aus POX die Freisetzung von Nonivamid retardieren, wodurch eine größere Menge an Wirkstoff an die Haut abgegeben werden konnte, so dass die Wirkung verglichen mit Cremes stärker war. Zhang et al (2002) berichteten von einer Kinetik 0. Ordnung bei der Freisetzung von Cetiofur, ein Cephalosporin zugelassen zur Behandlung von Tieren, aus POX-Gelen. Sie stellten auch fest, dass die freigesetzte Menge umso kleiner wurde, je höher der POX-Gehalt war. Dies kommt dadurch zustande, dass das von POX aufgebaute Netzwerk immer engmaschiger wird, so dass die Diffusion der Wirkstoffe aus dem Gelgerüst behindert wird [Ricci et al., 2005]. Mithilfe von POX konnte in einem intramuskulären Gel eine anhaltende Freisetzung von Deslorelin und von GnRH gezeigt werden. Gleichzeitig wurden beide Wirkstoffe vor ihrem Abbau geschützt [Wenzel et al., 2002]. Ein weiteres Beispiel für die effektive Kombination mehrerer Eigenschaften von POX wurde von Charrueau et al. (2001) gezeigt: eine 18 %ige, bei Raumtemperatur flüssige POX-Zubereitung, die bei Körpertemperatur halbfest wurde und eine sehr gute Bioadhäsion zeigte, diente zur kontrollierten Freisetzung von kurzkettigen Fettsäuren im Rektum. Auch am Auge wurde die Freisetzung von Pilocarpin erfolgreich retardiert. Hierfür wurde der Wirkstoff in eine POX-Matrix eingearbeitet, womit eine Erhöhung der Verweildauer am Gewebe erreicht und somit die Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes verbessert wurde [Desai und Blanchard, 2000].



## 2.4 Die Haut

### 2.4.1 Funktion und Aufbau der menschlichen Haut

Die menschliche Haut ist mit ca. 1,5 - 2 m<sup>2</sup> Fläche und einer Masse von ca. 10 kg nicht nur das größte und schwerste Organ des menschlichen Körpers, sondern auch das mit den vielseitigsten Funktionen. Zu diesen gehören die Abgrenzung von der Umwelt (Barrierefunktion), die Thermoregulation und die Funktion als Sinnesorgan. Weiterhin übernimmt die Haut wichtige Aufgaben im Stoffwechsel und in der Immunologie. Ferner hat die Haut eine wichtige soziale Funktion, da sie zum Beispiel Auskunft über das Alter oder die Herkunft einer Person gibt. Zuletzt hat die Haut auch Signalfunktionen, indem sie je nach Stimmung reagiert: man erblasst vor Angst oder errötet vor Wut.

Die Haut besteht aus drei histologisch abgrenzbaren Schichten: Epidermis, Dermis (die zusammen die Cutis bilden) und Subcutis Abbildung 2.7. Diese sind unterschiedlich aufgebaut und erfüllen somit unterschiedliche Aufgaben. Die Subcutis ist je nach Körperregion unterschiedlich dick. Sie besteht aus Bindegewebe und Fettzellen, womit sie sowohl Energie speichern kann, als auch den Organismus vor äußeren Einflüssen schützen und isolieren kann.

Die Dermis, auch bekannt als Lederhaut oder Korium, gibt der Haut eine hohe Widerstandskraft gegenüber mechanischer Beanspruchung. Sie besteht hauptsächlich aus Kollagen und Elastin, die ihr Stabilität und Elastizität verleihen. In der Dermis kommen außerdem Zellen der Immunabwehr (Makrophagen, Lymphozyten), Gefäße zur Versorgung der Haut und Nervenzellen zur Reizübermittlung vor.

Die Epidermis (Oberhaut) enthält keine Blutgefäße und ist auf die Dermis für die Versorgung mit Nährstoffen angewiesen. Sie besteht hauptsächlich aus einem geschichteten verhornenden Plattenepithel und ist je nach Körperregion unterschiedlich dick: von ca. 40 µm an den Augenlidern bis zu mehreren Millimetern an den Fuß- und Handsohlen. Die Epidermis lässt sich in weitere Schichten unterteilen (von innen nach außen): Stratum basale (Basalzellschicht), Stratum spinosum (Stachelzellschicht), Stratum granulosum (Körnerzellschicht), Stratum lucidum (Glanzschicht, nur an Handinnenflächen und Fußsohlen) und Stratum

corneum (Hornschicht). Die Keratinozyten, aus denen die Epidermis hauptsächlich besteht, werden nur im Stratum basale gebildet. Von da aus wandern sie in ca. 20 bis 30 Tagen nach außen, bis sie die Hautoberfläche erreichen. Entlang dieses Weges verändern sich die Keratinozyten ständig. Der Differenzierungsprozess fängt im Stratum spinosum an, wo die Bildung der so genannten „Odland Bodies“ beginnt. Diese Organellen enthalten hydrolytische Enzyme und Lipide, die später die Lipidmatrix der obersten Hautschicht bilden [Odland, 1960; Schurer und Elias, 1991]. Im Stratum granulosum folgt die Verhornung der Keratinozyten und damit verbunden der Zelltod. Außerdem findet man in dieser Zellschicht die Desmosomen, die als mechanischer Anker zwischen nebeneinanderliegenden Zellen fungieren und somit den Zusammenhalt der Epidermiszellen sicherstellen.

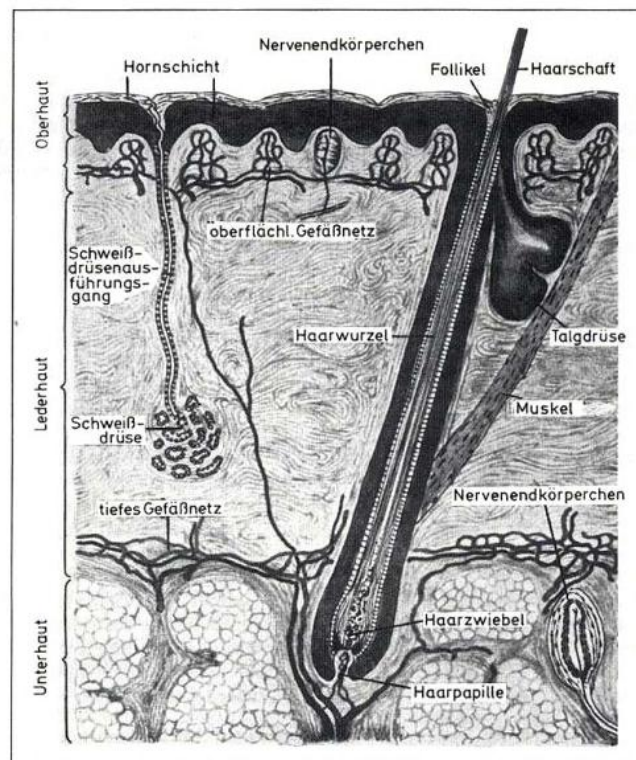


Abbildung 2.7: Aufbau der menschlichen Haut [Raab und Kindl, 1999].

#### 2.4.2 Aufbau des Stratum corneums

Das Stratum corneum (SC) ist die äußerste Schicht der menschlichen Haut und spielt somit eine wichtige Rolle als Barriere sowohl gegenüber exogenen Einflüssen als auch gegenüber dem transepidermalen Wasserverlust. Es besteht aus ca. 15 bis 20

an stark beanspruchten Stellen sogar aus bis zu 100 Corneozytenschichten. Diese sind in einem Gemisch aus Ceramiden, Cholesterol, Cholesterolestern und freien Fettsäuren, das von den „Odland bodies“ im Laufe der Differenzierung sezerniert wurde, verankert [Wertz und Downing, 1989]. Die Corneozyten sind tote ausdifferenzierte Keratinozyten, die 0,5 µm dick und 30-40 µm breit sind, und einen geringen Wassergehalt von ca. 15-20 % haben. Das gesamte SC unterliegt einer ständigen Erneuerung, während die obersten Schichten abgeschilfert werden. Letzteres ist möglich durch die Einwirkung von Enzymen auf die haltgebenden Desmosomen im SC disjunctum [Forslind, 1994].

Der Aufbau des SC kann mit dem von Elias (1983) vorgeschlagenen „Backstein-Mörtel“ Modell erklärt werden, bei dem die Corneozyten die Backsteine und die Lipidmatrix den Mörtel darstellen. Der komplexe Aufbau der Lipidmatrix, die aus hydratisierten Lipiddoppelschichten besteht, ist für die Barrierefunktion essentiell. Die geordneten Doppelschichten beinhalten polare wässrige Bereiche, in die die polaren Kopfgruppen der Fettsäuren hineinragen, und lipophile Regionen, die von den Alkylketten der Fettsäuren gebildet werden [Ziegenmeyer, 1989]. Der Zusammenhalt dieser Struktur ist durch Ceramide, die zur Ausbildung einer hochgeordneten Struktur fähig sind, gegeben [Landmann, 1991]. Die beschriebenen Doppelschichten unterscheiden sich erheblich von anderen menschlichen Zellmembranen bezüglich ihrer Fluidität und Permeabilität, da diese Ceramide anstelle von Phospholipiden enthalten.

### **2.4.3 Mikrostruktur des Stratum corneums**

Die beschriebene Anordnung und die Zusammensetzung des SC sind für die Erfüllung der Barrierefunktion von großer Wichtigkeit, denn nur intaktes SC ist in der Lage, vor Austrocknung und vor dem Eindringen von körperfremden Substanzen zu schützen. Sweeney und Downey (1970) konnten nachweisen, dass eine Extraktion von Lipiden mit verschiedenen Lösungsmitteln zu einem übermäßigen Wasserverlust führte. Golden et al. (1987) konnten mittels differenzkalorimetrischen und röntgenanalytischen Methoden nachweisen, dass Veränderungen in der Mikrostruktur des SC mit einer erhöhten Permeabilität einhergehen .

In Abbildung 2.8 ist ein Thermogramm zwischen 30 und 120 °C für isoliertes humanes SC dargestellt [Bouwstra et al., 1993]. In diesem Temperaturbereich

erfolgen vier charakteristische thermische Übergänge, die den in Tabelle 2.2 beschriebenen Prozessen zugeordnet werden. Von den vier dargestellten Übergängen ist T1 am kleinsten und nicht immer vorhanden. Die anderen drei sind meist deutlicher zu erkennen und können der Charakterisierung von Veränderungen der Mikrostruktur des SC dienen. Dafür muss das SC mit den zu untersuchenden Substanzen vorbehandelt und im Anschluss vermessen werden. Eine Verschiebung der Phasenübergänge zu niedrigeren Temperaturen oder kleinere Enthalpien im Vergleich zu unbehandeltem SC würden einen Hinweis auf eine Fluidisierung der Lipide und somit auf eine Veränderung der Mikrostruktur geben [Golden et al., 1986; Barry, 1991]. Dabei muss man bedenken, dass diese Übergänge stark vom Hydrationszustand des SC abhängig sind: je höher der Wassergehalt des SC ist, umso niedriger sind die Temperaturen, bei denen die Phasenübergänge stattfinden. Ein zu niedriger Wassergehalt lässt jedoch die Übergänge verschwinden. So konnte T4 nicht nachgewiesen werden, wenn der Wassergehalt im SC kleiner als 15 % war [Golden et al., 1986; Bouwstra et al., 1991a]. Wasser ist in der Lage mit den polaren Kopfgruppen der Lipide zu interagieren, wodurch die Wechselwirkungen zwischen den Kohlenwasserstoffketten verringert werden. Für den Phasenübergang ist deswegen weniger Energie nötig, so dass er bei niedrigeren Temperaturen stattfindet.

Mittels Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXD) wurden zwei Lamellarphasen in der Lipidmatrix des SC nachgewiesen. Bowstra et al. (2002) postulierten, dass die Lamellarphase mit dem größeren Netzebenenabstand (13,4 nm) für die Barrierefunktion des SC von großer Bedeutung sei. Mithilfe der Röntgenweitwinkelbeugung (WAXD) konnten zwei scharfe Interferenzen und zwei diffuse Halos beobachtet werden. Die scharfen Interferenzen bei 0,414 und 0,372 nm wurden kristallinen Lipiden einer orthorhombisch senkrechten Anordnung zugeordnet [Small, 1988]. Es wurde vorgeschlagen, dass sich die Lipide im SC nicht nur in einem kristallinen, sondern auch in einem Gel-Zustand befinden, da die Interferenz bei 0,42 nm auf eine lockere Packung mit einer hexagonalen Anordnung hinweist [Bouwstra et al., 1992]. Die amorphen Halos bei 0,98 und 0,46 nm wurden auf das Vorhandensein von Keratin in den Corneozyten zurückgeführt. Da das erhaltene Interferenzmuster jedoch sehr schwach war, konnte keine eindeutige Zuordnung durchgeführt werden [Cornwell et al., 1994], wobei Garson et al. (1991) behaupteten, dass das Interferenzmuster am ehesten mit dem von  $\beta$ -Keratin übereinstimmt. Stellt

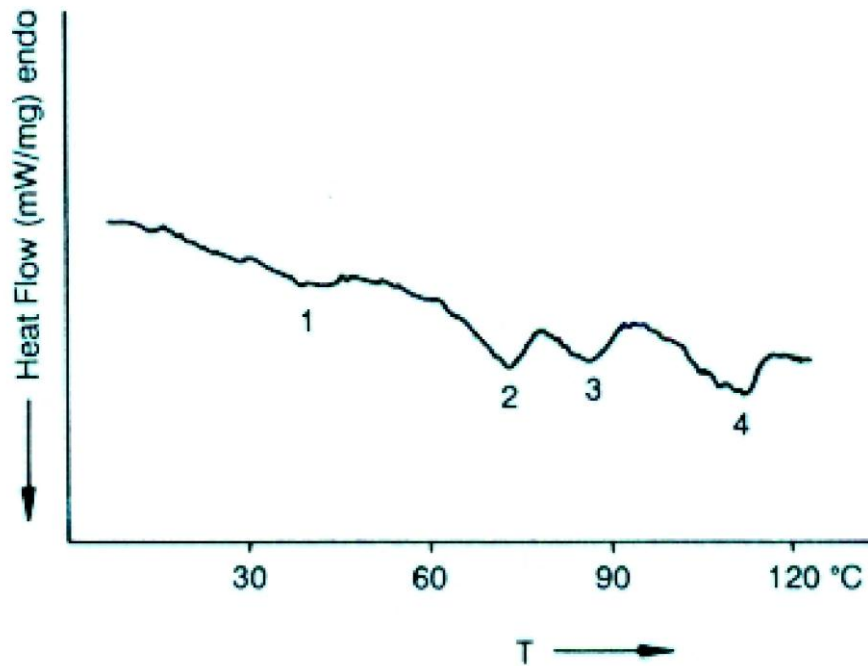


Abbildung 2.8: Thermogramm von isoliertem humanen Stratum corneum [Bowstra et al., 1993]

Tabelle 2.2: Phasenübergänge von isoliertem humanen SC [Bouwstra et al., 1991a; Bouwstra et al., 1991b; Bouwstra et al., 1992]

Phasenübergang	T[°C]	Beschreibung
T1	30 - 40	Reversible Umwandlung orthorhombisch angeordneter Strukturen zu einer hexagonalen Packung
T2	65 - 70	Schmelzen der lamellaren Lipidschichten, reversibler Verlust der Ordnung
T3	75 - 85	Irreversibler Übergang von proteinassoziierten Lipiden von einem Gel- in einen flüssigen Zustand
T4	105	Irreversible Denaturierung von Proteinen

man mit einer der beiden Methoden Veränderungen in der Lage der Interferenzen bzw. der Größe der Netzebenenabstände fest, so kann man von einer Strukturveränderung der Lipide ausgehen. In der Regel weist dies auf eine verbesserte Permeation hin.

#### **2.4.4 Permeationswege für Arzneistoffe**

Die Haut kann trotz ihrer wichtigen Barrierefunktion als Applikationsort für Arzneistoffe genutzt werden. Diese können entweder eine lokale oder eine systemische Wirkung entfalten. Für das Erreichen einer systemischen Wirkung muss der Arzneistoff zuerst das SC und die weiteren Schichten der Epidermis durchdringen, um bis zur Dermis zu gelangen, von wo er in die Blutbahn absorbiert wird [Ziegenmeyer, 1989]. Die systemische Applikation über die Haut ist allerdings von begrenzter Bedeutung, denn nicht jeder Arzneistoff besitzt die dafür benötigten Eigenschaften. Entscheidend ist die Lipophilie des Arzneistoffes, da für hydrophilere Moleküle die Hautbarriere schwerer zu durchdringen ist. Am besten geeignet sind laut Landmann (1991) Stoffe mit einem Verteilungskoeffizienten von 1 wie Nitroglycerin. Zu lipophile Moleküle neigen dazu, ein Depot in tieferen Schichten des SC auszubilden, da sie im lebenden Teil der Epidermis sehr schlecht löslich sind [Wiechers, 1989].

Für die Permeation durch das SC stehen grundsätzlich zwei Wege zur Verfügung Abbildung 2.9. Der interzelluläre Weg, der von lipophilen Stoffen bevorzugt wird, umgeht die Corneozyten und geht durch die Lipidmatrix hindurch. Der transzelluläre Weg geht durch die Corneozyten und die Lipidmatrix hindurch und wird von hydrophileren Substanzen gewählt. Der Weg, der letztendlich genommen wird, ist nicht nur von der Lipophilie der Arzneistoffe, sondern auch von deren Größe und von deren Verteilungs- und Diffusionskoeffizienten in den verschiedenen Hautschichten abhängig [Guy und Hadgraft, 1988]. Außerdem können Arzneistoffe und andere Substanzen auch über Haarfollikel, Talg- und Schweißdrüsen durch die Haut gelangen. Da der Anteil dieser Hautanhangsorgane bezogen auf die gesamte Haut sich aber nur auf ca. 0,1 % beschränkt, ist dieser Weg, der durch das Fehlen der Hornschicht eigentlich günstigere Eigenschaften für eine Penetration durch die Haut bieten würde, zu vernachlässigen [Ziegenmeyer, 1989]. Schließlich gibt es für große

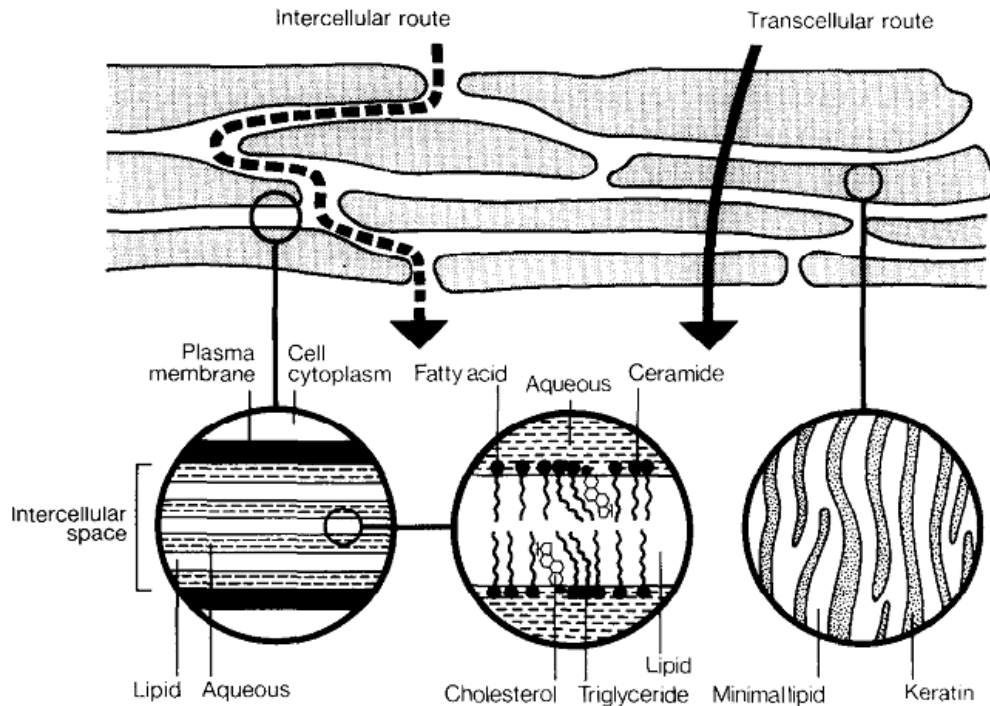


Abbildung 2.9: Darstellung der möglichen Permeationswege durch das Stratum corneum [Barry, 1987].

polare oder ionische Moleküle noch die Möglichkeit, das SC über Poren, so genannte Shunts, zu passieren [Bach und Lippold, 1998].

### 2.4.5 Permeationsverbesserung

Um die Permeation eines Arzneistoffes durch die Haut zu erhöhen, können verschiedene Maßnahmen getroffen werden, wie zum Beispiel die unter 2.2.3 beschriebenen chemischen Modifikationen oder physikalischen Methoden. In diesem Kapitel soll aber auf die Rolle von zugesetzten Stoffen, die die Permeation erleichtern, sogenannte Permeationsenhancer (PeEnh), eingegangen werden. Diese Stoffe sind in der Lage, die Mikrostruktur des SC kurzzeitig so zu verändern, dass der Durchtritt eines Arzneistoffes durch die Haut erleichtert wird. Diese Veränderung sollte reversibel sein und nicht zu Hautirritationen oder allergischen Reaktionen führen. Durch den Einsatz von PeEnh werden verschiedene Strukturbestandteile des SC angegriffen: es kann zu Interaktionen mit dem in den Keratinozyten vorliegendem Keratin oder mit den Lipiden der Lipidmatrix kommen. Bei den Lipiden sind entweder

die polaren Kopfgruppen, die wässrige Schicht zwischen diesen oder die lipophilen Ketten die Zielstrukturen [Barry, 1991].

Bouwstra et al. (1993) zeigten, dass die permeationsfördernde Wirkung von Wasser nur auf die Interaktion mit dem Keratin in den Corneozyten zurückzuführen ist, da die Netzebenenabstände in der Lipidmatrix nach Hydratisierung unverändert blieben. Wasser lagert sich an die Keratinfibrillen und hydratisiert so die Proteinketten. Auf diese Weise kommt es zu einer Schwächung der intermolekularen Wechselwirkungen. Eine weitere Aufnahme von Wasser führt zu einer Quellung der Corneozyten, die dann ein wässriges Protein-Gel darstellen, wodurch es zum permeationsfördernden Effekt kommt [Ziegenmeyer, 1989]. Außer Wasser können andere kleine polare PeEnh wie Dimethylsulfoxid oder Dimethylformamid mit dem Keratin interagieren, wobei sie hauptsächlich proteingebundenes Wasser ersetzen. Auch amphiphile Moleküle, wie Natriumlaurylsulfat, interagieren mit dem Keratin, so dass die transzelluläre Permeation erleichtert wird [Bach und Lippold, 1998]. Polare Substanzen können außerdem mit den polaren Gruppen der Lipide über Wasserstoffbrückenbindungen oder ionische Wechselwirkungen interagieren, so dass sich der Hydratations- bzw. Solvationszustand der Lipide verändert. Als Folge davon kommt es zu einer Erhöhung der freien Wassermenge innerhalb der Lipiddoppelschichten, die zu einer Fluidisierung und damit zu einer Permeationsverbesserung, die auch für unpolare Substanzen gilt, führt.

Der verbesserte Durchtritt von apolaren Substanzen kommt dadurch zustande, dass die Veränderung des Hydratationszustandes der polaren Gruppen die Ordnung im lipophilen Bereich der Lipide stört [Barry, 1987; Barry, 1991]. Dieser Bereich kann aber auch von sehr lipophilen Stoffen, wie Azonen oder langkettigen ungesättigten Fettsäuren modifiziert werden, da sie interkalierend eingebaut werden können, wodurch die Lipide auseinanderweichen. Dadurch wird der laterale Abstand und somit die Beweglichkeit der Lipide größer, wodurch es zu einer höheren Durchlässigkeit kommt [Barry, 1987].

Zuletzt können Stoffe eingesetzt werden, die die Löslichkeit in der Formulierung und in der Haut erhöhen, wie zum Beispiel Ethanol (EtOH), Propylenglykol (PG), Diethylenglykol und unterschiedliche Ester [Yazdanian und Chen, 1995]. Diese Stoffe können selbst durch die Haut permeieren und somit den Transport von gelösten Substanzen durch die Haut ermöglichen, wodurch es zu einer Verbesserung der Löslichkeit in lipophilen Strukturen der Haut kommt. Außerdem können EtOH und



andere Alkohole einige Proteine und Lipide aus dem SC extrahieren und damit die Porosität erhöhen. Ferner sind EtOH und PG dafür bekannt, die Lösungseigenschaften der Wasserschicht, die sich zwischen den Kopfgruppen der Lipide befindet, positiv zu beeinflussen, so dass die Löslichkeit eines Arzneistoffes und somit sein Diffusionskoeffizient erhöht werden kann [Neubert et al., 1996].

#### **2.4.6 Quantifizierung der Arzneistoffaufnahme durch die Haut**

Die Durchführung von Permeationsuntersuchungen erlaubt eine Quantifizierung der Aufnahme eines Wirkstoffes durch die Haut, sowie ein besseres Verständnis der Wechselwirkungen zwischen dem Vehikel und der Haut.

Als Barriere für diese Untersuchungen kann Vollhaut angewendet werden, bei der für manche Stoffe eine Korrelation zur In-vivo-Permeation gezeigt werden konnte [Franz, 1975]. Die Verwendung von isoliertem SC ist dennoch sinnvoll, da diese Schicht die Hauptbarriere der Haut darstellt. SC besteht aus toten Zellen, die durch die Präparation für den Permeationsversuch nicht negativ beeinflusst werden. Außerdem erlaubt die Isolierung eine Lagerung von SC, womit die Handhabung und die Durchführung der Permeationsuntersuchungen erleichtert werden. Als Nachteile von SC als Diffusionsbarriere für solche Untersuchungen gelten die durch die Versuchsanordnung auftretende Quellung, die Tatsache, dass SC hauptsächlich als Barriere für hydrophile Stoffe gilt und dass es nicht möglich ist, eine Akkumulation von lipophilen Wirkstoffen in lebenden Schichten zu beobachten [Barry, 1983]. Die Quellung behindert eine Korrelation mit In-vivo-Daten, da Wasser als Penetrationsverbesserer agiert. Somit könnten Wirkstoffe, für die unter physiologischen Bedingungen das SC undurchlässig ist, durch die während des Versuches aufgequollene Schicht diffundieren.

Die Arzneistoffpermeation durch das SC ist ein diffusionskontrollierter Prozess, der sich mit dem Arzneistoffflux  $J$  charakterisieren lässt. Dieser gibt die pro Zeit und Fläche diffundierte Arzneistoffmenge wieder und basiert auf dem Fick'schen Diffusionsgesetz:

$$J = \frac{d_m}{d_t} \frac{D_s c_0 K}{h}$$

$D_s$  = scheinbarer Diffusionskoeffizient in der Haut [ $\text{cm}^2/\text{s}$ ]

$c_0$  = Ausgangskonzentration des Arzneistoffes [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ]

$K$  = Verteilungskoeffizient Haut/Donator

$h$  = effektive Hautdicke [ $\text{cm}$ ]

Voraussetzung für seine Berechnung ist das Vorliegen von perfect-sink Bedingungen, wobei die Arzneistoffmenge im Akzeptorkompartiment Werte von 10 % der Sättigungskonzentration des Arzneistoffes nicht übersteigt [Higuchi, 1962]. Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wird  $J$  als die Steigung des linearen Teils des Graphens definiert, der sich durch das Auftragen von pro Fläche permeierter Menge gegen die Zeit ergibt.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### **Poloxamer 407 (POX)**

Poloxamer 407 (POX) ist ein Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Blockpolymer, das hauptsächlich als Gelbildner und Konsistenzgeber angewendet wird [BASF, 2005]. Für eine genauere Beschreibung von POX s. Kapitel 2.3. Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurde POX in verschiedenen Qualitäten eingesetzt, die von den jeweiligen Firmen freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. So standen Pluronic<sup>®</sup> F127 (Dolorgiet, St. Augustin, Bonn) (PLU), Lutrol<sup>®</sup> F127 (BASF, Ludwigshafen) (LUT) und Synperonic<sup>®</sup> PE/F127 (CRODA, Redcar, Großbritannien) (SYN) zur Verfügung. Außerdem wurde eine kleine Menge Poloxamer 407 von Fagron (FAG) bezogen.

In Kapitel 4.1 wurde ausschließlich mit PLU gearbeitet, während LUT in Kapitel 4.2 eingesetzt wurde. Zur Vereinfachung wird aber in diesen beiden Kapiteln POX als Abkürzung für PLU und LUT benutzt. Für die Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit und Chargenkonformität (Kapitel 4.3) wurden alle POX-Chargen eingesetzt. Dabei lag im Falle von PLU, LUT und FAG eine weiße körnige Substanz und SYN in Form von Plättchen vor.

#### **Miglyol 840**

Miglyol 840 (MIG) ist die Handelsbezeichnung für den Propylenglykoldiester der Capryl-Caprinsäure. Es handelt sich um ein farbloses, geschmack- und geruchsneutrales, sehr dünnflüssiges Öl mit sehr guter Haut- und Schleimhautverträglichkeit. Es wird für die Herstellung von gut spreitenden, schnell in das SC eindringende Zubereitungen empfohlen [Fiedler, 2007]. MIG wurde von der Firma Sasol Germany GmbH (Witten) bezogen.

#### **Dimethylisosorbid**

Dimethylisosorbid (DMIS), der Dimethylether des Anhydrids eines Sorbit-Isomers, ist eine klare Flüssigkeit mit isopropylalkoholähnlichem Geruch, die mit Wasser und den meisten organischen Lösemitteln mischbar ist und selbst als Lösungsmittel für

verschiedene organische Stoffe eingesetzt werden kann [Fiedler, 2007]. In halbfesten Zubereitungen findet es Verwendung als Lösungsvermittler. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Qualitäten eingesetzt: DMIS von der Firma Dologiet (St. Augustin, Bonn), das für die Untersuchungen in Kapitel 4.1 eingesetzt wurde und Arlasolve™ DMI von CRODA (Redcar, Großbritannien), das für die Untersuchungen in Kapitel 4.2 und 4.3 eingesetzt wurde.

### **Isopropylalkohol**

Isopropylalkohol (IPA), eine farblose, scharf aromatisch riechende Flüssigkeit, ist ein klassisches Lösungs- und Desinfektionsmittel. Er kann als Penetrationsverbesserer in halbfeste Zubereitungen eingearbeitet werden, da er in der Lage ist, Lipide aus dem SC herauszulösen, womit die Permeation für andere Stoffe erleichtert wird. IPA wurde von der Firma Merck KGaA (Darmstadt) in HPLC-Qualität bezogen.

### **Wasser**

Wasser wurde durch Bidestillation gewonnen und ausschließlich in dieser Qualität eingesetzt.

### **5-Aminolävulinsäure**

5-Aminolävulinsäure (ALA), eine weiße, kristalline Substanz, wurde als Hydrochlorid (Molekülmasse 167,6 g/mol, Schmelzpunkt 151-154 °C, pKa1 = 3,90, pKa2 = 8,05) eingesetzt. Diese Substanz ist bei sauren pH-Werten zwischen 2 und 2,5, bei denen die Amino-Gruppe protoniert ist, stabil. In wässrigen, auf physiologischen pH gepufferten Lösungen, reagiert ALA zu verschiedenen Kondensationsprodukten, die sich durch eine Gelbfärbung auszeichnen [Novo et al., 1996]. ALA wurde freundlicherweise von der Firma Medac GmbH (Wedel) zur Verfügung gestellt.

### **Lidocain**

Das Lokalanästhetikum Lidocain, das auch als Antiarrhythmikum (Klasse 1b) eingesetzt werden kann, ist eine weiße, kristalline Substanz (Molekülmasse 234,34 g/mol, Schmelzpunkt 68-69 °C) [Pharmazeutische Stoffliste, 2009] und wurde von der Firma Oskar Tropitsch (Marktrechwitz) bezogen.

**EMLA**

EMLA<sup>®</sup> Creme enthält jeweils 2,5 % Lidocain und Prilocain und wird zur örtlichen Schmerzausschaltung eingesetzt. Die Cremegrundlage enthält Poly(oxyethylen)-54-hydriertes-Rizinusöl, Carbomer 974P, Natriumhydroxid und gereinigtes Wasser. Das Fertigpräparat wurde in einer Apotheke erworben.

**Sonstige Materialien**

Sonstige Materialien wie z.B. Puffersubstanzen oder Reagenzien, die für die Durchführung von bestimmten Untersuchungen verwendet wurden, werden unter der jeweiligen Methode (3.2) beschrieben.

**3.2 Methoden****3.2.1 Herstellung der arzneistofffreien Grundlagen und der lidocainhaltigen Zubereitungen**

Für die Herstellung der Grundlagen wurde der Cito-UNGUATOR<sup>®</sup>-2000 (Konietzko GmbH, Bamberg) verwendet. Zuerst wurde POX und dann alle weiteren Bestandteile der Grundlagen in eine handelsübliche Unguator-Kruke eingewogen. Anschließend wurde diese Mischung bei 1450 upm für ca. 2 min automatisch gerührt. Die Zubereitungen wurden direkt nach der Herstellung bei 20 °C aufbewahrt und erst nach einem Tag Lagerung untersucht. Die Einarbeitung von Lidocain erfolgte während der Herstellung, indem der Arzneistoff als weiterer Bestandteil eingewogen wurde.

**3.2.2 Einarbeitung von ALA**

Die Einarbeitung von ALA erfolgte ebenfalls mithilfe des Cito-UNGUATOR<sup>®</sup>-2000 (Konietzko GmbH, Bamberg) bei 1450 upm für ca. 2 min einen Tag nach Herstellung der Grundlage und unmittelbar vor der Untersuchung, da dieser Wirkstoff nur begrenzt stabil ist [Novo et al., 1996].

### 3.2.3 Graphische Darstellung in einem Mischungsdreieck

Halbfeste Zubereitungen stellen Mehrkomponentensysteme dar. Mit so genannten Mischungsdreiecken oder Dreiecksdiagrammen wird eine graphische Darstellung solcher Systeme möglich (Abbildung 3.1). Jede Ecke stellt 100 % einer Komponente oder einer Mischung aus mehreren Komponenten mit konstantem Mischungsverhältnis dar. Die Seiten solcher Diagramme repräsentieren binäre Mischungen bzw. Mischungen aus zwei der drei Komponenten(mischungen), während innerhalb der Diagramme alle möglichen ternären Mischungen bzw. Mischungen mit allen Bestandteilen in den gegebenen Mischungsverhältnissen realisiert werden können. Als weitere Besonderheit eines Mischungsdreiecks gilt, dass die Geraden, die von einer Spitze des Dreiecks zur gegenüberliegenden Seite gehen, Mischungen mit jeweils konstantem Verhältnis der beiden anderen Komponenten(mischungen) darstellen. Außerdem repräsentieren Systeme, die auf einer Parallelen zu einer Dreiecksseite liegen, Systeme mit einem konstanten Anteil einer Komponente bzw. Komponentenmischung.

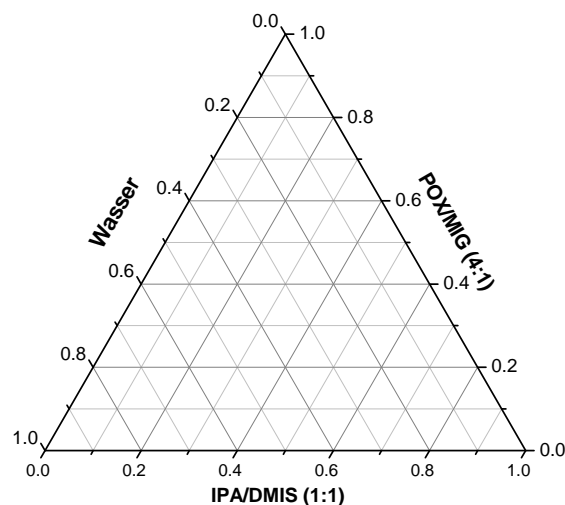


Abbildung 3.1: pseudoternäres Mischungsdreieck zur Darstellung des Mehrkomponentensystems aus POX, IPA, DMIS, MIG und Wasser.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Zubereitungen mit festen Mischungsverhältnissen (m/m) von IPA und DMIS (1:1), POX und MIG (4:1) und bidestilliertem Wasser hergestellt, die sich innerhalb des pseudoternären Mischungsdreiecks in Abbildung 3.1 befanden. Die Bezeichnung der Rezepturen beschreibt die enthaltenen Mengen an Hilfsstoffen. Die zwei ersten Ziffern weisen auf die eingesetzte Menge an

POX/MIG hin. Die zwei nächsten stehen für die Menge an eingesetztem IPA/DMIS. Die Menge an Wasser ist in der Bezeichnung nicht enthalten, kann aber aus der Differenz von 100 und den zwei anderen Mengen errechnet werden. Alle Prozentangaben sind als Massenprozent zu verstehen.

### **3.2.4 Makroskopische Charakterisierung**

Die makroskopische Charakterisierung beinhaltete die Untersuchung von Konsistenz und Homogenität sowie die Beurteilung eines eventuell vorhandenen Ringing-Effekts. Die Untersuchung erfolgte einen Tag nach der Herstellung (Lagerung bei 20 °C), da in einer früheren Arbeit festgestellt werden konnte, dass die Systeme eine gewisse Zeit brauchen, um sich vollständig auszubilden [Grüning, 2007]. Zur Untersuchung von Konsistenz und Homogenität wurde eine Spatelspitze der Zubereitung auf einen Objektträger aufgetragen. Durch leichtes Klopfen der Unguator-Kruken gegen die Arbeitsfläche wurde bei Raumtemperatur der Ringing-Effekt durch eventuell vorhandene hörbare Resonanzeffekte festgestellt.

### **3.2.5 Mikroskopische Charakterisierung**

#### **3.2.5.1 Polarisationsmikroskopie (PolMik)**

Die mikroskopische Untersuchung von Strukturen und Texturen erfolgte mithilfe eines Polarisationsmikroskops Leica DM LM (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) einen Tag nach der Herstellung. Ein Polarisationsmikroskop erlaubt zusätzlich zur normalen mikroskopischen Darstellung die Abbildung optisch anisotroper Strukturen wie Kristalle und Flüssigkristalle (außer kubische Phasen). Dafür sind zwei gekreuzte Polarisatoren eingebaut, die bei anisotropen Systemen nur einen bestimmten Anteil des Lichtes passieren lassen, wodurch es zu Texturerscheinungen kommt. Zur farbigen Darstellung der Texturen ist ein  $\lambda$ -Plättchen mit einem Gangunterschied von  $\lambda = 550 \text{ nm}$  vorhanden. Die fotografischen Aufnahmen wurden mit einer Digitalkamera Olympus DP12 (Olympus, Hamburg) und die Bearbeitung der Bilder mit der dazugehörigen Software Olympus DP 12 Version 3.2 (Soft Imaging System GmbH, Münster) durchgeführt.

### **3.2.5.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)**

Ausgewählte Systeme wurden mithilfe der Transmissionselektronenmikroskopie untersucht, nachdem sie mittels Gefrierbruchtechnik präpariert worden waren. Diese Präparationstechnik ermöglicht eine Fixierung der kolloidalen Struktur der Proben. Dafür wurden zuerst die Proben in schmelzendem Stickstoff ( $T = -63 \text{ K}$ ) zwischen zwei Probenhaltern aus Gold schockgefroren. Anschließend wurden sie in einer Gefrierbruchätzanlage BAF 400 (Balzers, Wiesbaden) bei  $173 \text{ K}$  gebrochen und danach im Winkel von  $45^\circ$  mit Platin-Kohle bedampft ( $2 \text{ nm}$  Schichtdicke). Im Anschluss wurden die Proben senkrecht zur Bruchfläche mit reiner Kohle bedampft ( $20 \text{ nm}$  Schichtdicke). Die so erhaltenen Replika wurden mit konzentrierter Schwefelsäure und Wasser gereinigt und danach auf Kupfernetze aufgebracht. Die Untersuchung erfolgte mit einem Transmissionselektronenmikroskop TEM Zeiss LEO 922 Omega (Zeiss, Oberkochen) bei einer Beschleunigungsspannung von  $200 \text{ kV}$ . Die Bildaufnahmen erfolgten mit einer Digitalkamera Proscan CCD (Proscan, Lagerlechfeld) und wurden mithilfe der Software ITEM bearbeitet.

### **3.2.6 Rheologische Untersuchungen**

Die Rheologie ist die Lehre vom Fließ- und Deformationsverhalten flüssiger und halbfester Systeme unter dem Einfluss unterschiedlicher Scherkräfte. Mithilfe der Rheologie lassen sich wichtige Parameter bestimmen, die als Identitäts- und/oder Stabilitätskriterium angewendet werden können. Rheologische Untersuchungen wurden im Oszillationsmodus mit einem Bohlin Rheometer CVO 50 (Bohlin Instruments, Gloucestershire, United Kingdom), das mit einem Kegel-Platte-System (Durchmesser  $20 \text{ mm}$ , Kegelöffnungswinkel  $1^\circ$ ) ausgerüstet war, durchgeführt. Für die Messung wurde eine kleine Menge auf die Platte aufgetragen und eine Lösemittelfalle eingesetzt, um die Verdunstung flüchtiger Bestandteile zu verhindern.

#### **3.2.6.1 Bestimmung des linear viskoelastischen Bereiches (LVEB)**

Die Bestimmung des linear viskoelastischen Bereiches (LVEB) erfolgte mithilfe eines Amplitudensweeps bei einer Frequenz von  $0,5 \text{ Hz}$ , der je nach Konsistenz der



Zubereitung zwischen 0 und 2000 Pa durchgeführt wurde. Der LVEB ist daran erkennbar, dass sich das elastische Modul  $G'$  in einem definierten Schubspannungsbereich nicht ändert und ein Plateau ausbildet. Aus dem LVEB wurde eine geeignete Schubspannung für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Im Anschluss wurde mittels eines Frequenzsweeps von 0,01 bis 1,0 Hz überprüft, ob die ausgesuchte Schubspannung sich tatsächlich innerhalb des LVEB befand.

### 3.2.6.2 Charakterisierung der Konsistenz

Für die Charakterisierung der Konsistenz wurde ein Frequenzsweep ( $n = 3$ ) zwischen 0,01 und 1,0 Hz innerhalb des LVEB durchgeführt [Mayol et al., 2008]. Als charakteristische Größe wurde bei einer Frequenz von 0,5 Hz entweder die komplexe Viskosität (Gleichung 3.1), die sowohl viskose als auch elastische Anteile enthält, oder der Phasenwinkel (Gleichung 3.2), der die Anwesenheit und das Ausmaß an elastischem Verhalten darstellt, genommen.

$$\eta^* = \sqrt{\eta'^2 + \eta''^2} \quad \text{Gleichung 3.1}$$

$$\tan \delta = G''/G' \quad \text{Gleichung 3.2}$$

$\eta'$  = Realteil der komplexen Viskosität

$\eta''$  = Imaginärteil der komplexen Viskosität

$G'$  = elastisches Modul

$G''$  = viskoses Modul

Wie aus den Gleichungen zu erkennen ist, kann mit beiden Größen aufgrund der enthaltenen Parameter die Konsistenz von halbfesten (viskoelastischen) Zubereitungen beschrieben werden. Dabei verhält sich die komplexe Viskosität wie die normale Viskosität: je höher der erhaltene Wert, umso fester ist die Zubereitung. Der Phasenwinkel von halbfesten Zubereitungen bewegt sich zwischen 0 und 90 °, wobei 0° eine rein elastische und 90° eine rein viskose Substanz darstellt.

### 3.2.6.3 Bestimmung des Thermogelierungspunktes (TGP)

Die rheologische Bestimmung des Thermogelierungspunktes (TGP) ( $n = 3$ ) wurde im LVEB des gelierten Systems mithilfe eines Temperatursweeps zwischen 4 °C und je nach Zubereitung 30 bis 60 °C durchgeführt. Um den TGP zu charakterisieren, wurden das elastische Modul ( $G'$ ) (Gleichung 3.3) und das viskose Modul ( $G''$ ) (Gleichung 3.4) sowie der Phasenwinkel  $\delta$  (Gleichung 3.2) verwendet. Der TGP kann bei der Temperatur ermittelt werden, bei der das System von einem dominierenden viskosen Verhalten ( $G'' > G'$ ) in ein dominierendes elastisches Verhalten ( $G' > G''$ ) übergeht bzw. bei der der Phasenwinkel  $\delta$  einen Wert von 45 ° erreicht [Ross-Murphy, 1994]. Die benutzten Schubspannungen variierten je nach Konsistenz der Systeme und werden deswegen bei den Ergebnissen mit angegeben.

$$G' = G^* \cos \delta \quad \text{Gleichung 3.3}$$

$$G'' = G^* \sin \delta \quad \text{Gleichung 3.4}$$

$G^*$  = komplexes Schubmodul

### 3.2.7 Röntgenuntersuchungen

Mittels Röntgenuntersuchungen lassen sich Informationen über den Aufbau kolloidalen, kristallinen und flüssigkristallinen Strukturen gewinnen. Dabei ist die Röntgenbeugung ein Phänomen, das aufgrund von Periodizitäten in der Struktur der untersuchten Systeme auftritt. Als Resultat erhält man eine Beugungskurve, die eine Streukurve mit scharfen Maxima darstellt. Die Lage dieser Maxima (Beugungswinkel  $\theta$ ) ist über die Bragg'sche Beziehung (Gleichung 3.5) mit dem Netzebenenabstand  $d$  verbunden:

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad \text{Gleichung 3.5}$$

Dabei ist  $n$  die Ordnung des Reflexes und  $\lambda$  die Wellenlänge der verwendeten Röntgenstrahlen. Aus dieser Beziehung wird ersichtlich, dass der Netzebenenabstand und der Beugungswinkel sich reziprok zueinander verhalten.

Deswegen lassen sich mithilfe der Röntgenweitwinkelbeugung ( $2\theta > 5^\circ$ ) kristalline Strukturen mit kleinen Netzebenenabständen und mit der Röntgenkleinwinkelbeugung ( $2\theta < 5^\circ$ ) flüssigkristalline Strukturen mit größeren Netzebenenabständen untersuchen.

### 3.2.7.1 Röntgenweitwinkelbeugung (WAXD)

Die Röntgenweitwinkeluntersuchungen (Wide Angle X-ray Diffraction, WAXD) wurden mithilfe eines Goniometers PW3040/60, das mit einer Röhre PW3373/00 mit Kupferanode bestückt war, durchgeführt. Der Generator wurde mit einer Beschleunigungsspannung von 40 kV und einem Anodenstrom von 40 mA betrieben, so dass Röntgenstrahlung mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 0,1542$  nm erzeugt wurde (alles PANalytical, Almelo, Niederlande). Die Proben wurden im Bereich zwischen 3 und 45  $^\circ 2\theta$  untersucht. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mithilfe der Software X'Pert HighScore Version 2.1.

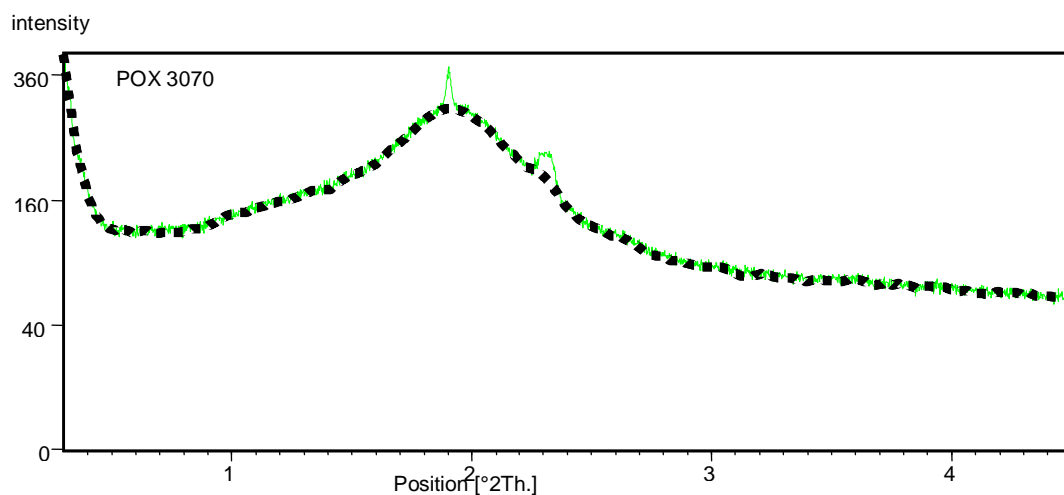


Abbildung 3.2: Gemessene Intensitäten (—) und errechnete Basislinie (----) mit einem Krümmungsfaktor von 50 für POX3070 ein System mit geringen kristallinen Anteilen. Die Fläche unter der Basislinie stellt die röntgenamorphen und die Fläche über ihr die kristallinen Anteile dar [van Hemelrijck und Müller-Goymann, 2011].

Für Systeme, die kristalline Anteile aufwiesen, wurde eine Berechnung der Kristallinität durchgeführt, indem eine Basislinie mit einem definierten Krümmungsfaktor automatisch generiert wurde. Für die Berechnung wurde angenommen, dass die Fläche unter der Basislinie die röntgenamorphe und die Fläche über ihr die kristallinen Anteile darstellt (Abbildung 3.2). Zusätzlich wurde der so ermittelte Wert für die Kristallinität von reinem POX als 1 gesetzt und somit eine relative Kristallinität ausgerechnet, mit der es einfacher war, die Kristallinitäten der komplex zusammengesetzten Systeme zu vergleichen.

### **3.2.7.2 Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXD)**

Die Röntgenkleinwinkeluntersuchungen (Small Angle X-ray Diffraction, SAXD) erfolgten mit einer Kratky Kompakt Kamera (Hecus X-ray systems, Graz, Österreich), die mit einem Röntgengenerator ID3003 (Rich. Seifert, Ahrensburg) verbunden war. Mithilfe eines positionsempfindlichen Detektors PSD-50M (Braun, Garching) (Abstand zur Probe 27,7 cm, Kanallänge 54  $\mu\text{m}$ ) wurden die Messungen bei Raumtemperatur für eine Dauer von 600 s durchgeführt. Die untersuchten Proben wurden in einem Pastenträger (Hecus Braun X-ray systems, Graz, Österreich) vermessen.

### **3.2.8 Gewinnung, Isolierung und Aufbewahrung des humanen Stratum corneums**

Für verschiedene Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurde humanes isoliertes Stratum corneum (SC) verwendet, das aus Hautspenden, die in der plastischen Chirurgie angefallen waren, stammte. Dabei handelte es sich um Haut gesunder weiblicher Patienten unterschiedlichen Alters aus der Brust- und Bauchregion, die von Dr. Czech aus der Klinik Campestrasse in Braunschweig zur Verfügung gestellt wurden bzw. von Dr. Schmidt (Arzt für Gynäkologie und Geburtshilfe, Wolfenbüttel) bezogen wurden.

Zur Gewinnung des SC wurde zuerst die frisch exzidierte Haut vom Unterhautfettgewebe mithilfe eines Skalpells befreit. Anschließend wurde das Gewebe in Aluminiumfolie verpackt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -25 °C bis zur weiteren Anwendung gelagert. Die Isolierung des SC erfolgte nach

einer leicht modifizierten Methode von Kligman und Christophers (1963). Das aufgetaute SC wurde nach dem vorsichtigen Entfernen von weiteren Schichten (Lederhaut) in eine 50 mg/100 ml Trypsinlösung (Trypsin, 2500 USP-U/mg, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) bei 37 °C für 48 h eingelegt. Nach der Inkubationszeit konnte das SC vom restlichen Gewebe mit einer Pinzette abgelöst werden. Anschließend wurde es in einer 40 mg/100 ml Trypsininhibitorlösung (Trypsininhibitor, Typ II-O: Chicken egg white, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) gewaschen, um weitere enzymatische Reaktionen zu verhindern. Nach zweimaligem Waschen mit Wasser wurde das SC auf ein Teflonsieb gespannt und über Silicagel für mindestens zwei Tage in einem Exsikkator getrocknet. Da es während der Lagerung zu zersetzungsbedingten Veränderungen kommen kann, wurde das SC nur innerhalb von sechs Monaten nach der Präparation verwendet.

### 3.2.9 Permeationsuntersuchungen

Für die Permeationsuntersuchungen wurden modifizierte Franz-Zellen (Abbildung 3.3) eingesetzt, die in einem Wasserbad auf 37 °C temperiert wurden, so dass die Temperatur im Donorkompartiment auf Hauttemperatur gehalten werden konnte (32 °C). Im Donor befand sich die mit dem Wirkstoff angereicherte Zubereitung und im Akzeptorkompartiment ein geeigneter Puffer. Das SC wurde zuerst voll hydratisiert. Im Anschluss wurde es zwischen den beiden Kompartimenten, deren Kontaktflächen dünn mit Silikonpaste (Baysilone-Paste mittelviskos, GE Bayer Silicones, Leverkusen) eingeschmiert worden waren, auf einen Polycarbonatfilter (Isopore<sup>TM</sup> TMTP 5.0 µm, Millipore, Irland) aufgebracht. Das Filter diente nur zur Stabilisierung des SC und hatte keinerlei Einfluss auf die Permeation. Die Permeationsuntersuchungen wurden über einen Zeitraum von 30 h durchgeführt. Dabei wurden über den Arm der modifizierten Franz-Zelle mithilfe einer Hamilton-Spritze zu vorgegebenen Zeiten jeweils 250 µl Probe gezogen und das Volumen mit frischem Puffer ergänzt. Anschließend wurde die Arzneistoffkonzentration der Proben mittels HPLC-Analyse detektiert.

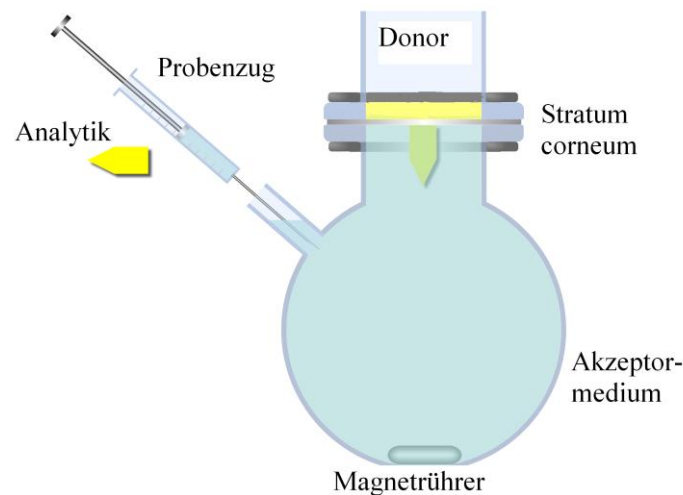


Abbildung 3.3: Modifizierte Franz-Zelle für Permeationsuntersuchungen [Grüning, 2007].

### 3.2.9.1 Permeationsuntersuchungen mit ALA

Für die Permeationsuntersuchungen mit ALA wurden aus dem SC Stanzlinge mit 17 mm Durchmesser ausgestanzt. Die Permeationsfläche der Zellen variierte zwischen 0,59 und 0,74 cm<sup>2</sup> und das Volumen des Akzeptormediums betrug zwischen 5,30 und 7,05 ml. Das Akzeptormedium bestand aus 30 mg Natriumhydrogenphosphat und 2,50 g Natriumdihydrogenphosphat gelöst in Wasser zu 100 ml und war auf pH 5,0 eingestellt (Phosphatpuffer pH 5,0) [Pharmacopoea Helvetica, 1997]. Es wurden Proben nach 2, 4, 7, 10, 14, 24 und 30 Stunden gezogen und es wurde mit n = 3 bis n = 5 gearbeitet.

### 3.2.8.2 Permeationsuntersuchungen mit Lidocain

Im Falle von Lidocain wurden SC-Stanzlinge mit 15 mm Durchmesser ausgestanzt. Diese wurden in Zellen mit Permeationsflächen zwischen 0,46 und 0,58 cm<sup>2</sup> und Akzeptorvolumina zwischen 4,60 und 7,35 ml platziert. Der eingesetzte Puffer war Phosphatpuffer pH 7,4 (PBS Tablets, MP Biomedicals, USA). Es wurden Proben nach 3, 6, 10, 14, 24 und 30 Stunden gezogen und es wurde immer mit n = 3 gearbeitet.

### 3.2.10 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

#### 3.2.10.1 HPLC-Analytik von ALA

##### 3.2.9.1.1 Vorsäulenderivatisierung

Die Detektion von ALA wurde fluorimetrisch nach einer Vorsäulenderivatisierung mit o-Phthaldialdehyd (OPA) (Fluka, Neu-Ulm) durchgeführt. In Anwesenheit von reduzierendem 2-Mercaptoethanol reagieren ALA und OPA innerhalb kürzester Zeit zu einem fluoreszierenden Produkt [Roth, 1971] (Abbildung 3.4). Das OPA-Reagenz (5 ml) wurde hergestellt, indem zunächst 27 mg OPA in 500 µl Ethanol LiChrosolv (Merck KgaA, Darmstadt) im Ultraschallbad gelöst wurden. Dieser Lösung wurden danach 4,50 ml Boratpuffer (0,4 mol/l Borsäure, mit 0,1 mol/l Natronlauge auf pH 9,5 eingestellt) und 25 µl 2-Mercaptoethanol (Merck KgaA, Darmstadt) zugefügt. Das Reagenz wurde dann bei Raumtemperatur über Nacht gelagert [Ho et al., 1986].

Die Derivatisierung erfolgte direkt vor der Durchführung der HPLC. Dafür wurden 200 µl OPA-Reagenz zu der gleichen Menge an Probe gegeben. Nach einer Reaktionszeit von genau 2 min wurde ein Aliquot dieser Mischung auf die Säule (Reversed Phase-Trennsäule 250 x 4,6 mm) gegeben, die mit einer Vorsäule (10 x 4,6 mm) verbunden war (beide: CROM, Herrenberg-Kayh; Füllmaterial Hypersil ODS 5 µm).

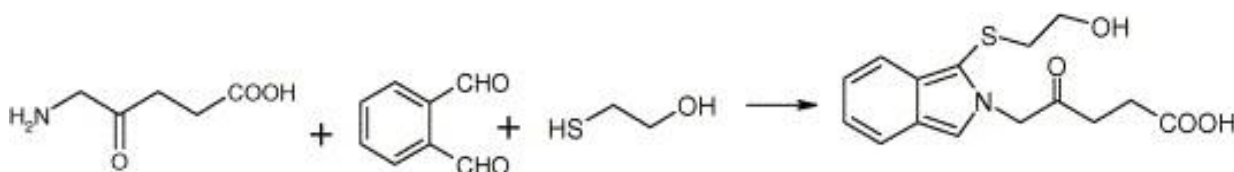


Abbildung 3.4 Reaktion von ALA und o-Phthaldialdehyd (OPA) in Anwesenheit von 2-Mercaptoethanol zu einem fluoreszierenden Produkt [Donnelly et al., 2006].

### **3.2.9.1.2 Quantifizierung mittels HPLC**

Die Quantifizierung von ALA erfolgte mit einer HPLC-Pumpe Spectroflow® 400 solvent delivery system (Kratos Analytical, New Jersey, USA) und einem Fluoreszenzdetektor RF 353 Fluorescence HPLC Monitor (Shimadzu, Kyoto, Japan) nach der Vorsäulenderivatisierung (3.2.9.1.1). Für die Detektion wurde ALA mit einer Wellenlänge von 330 nm angeregt und die Emission bei einer Wellenlänge von 418 nm gemessen. Zum HPLC-System gehörte auch ein Knauer Autosampler MIDAS analytical version (Knauer, Berlin). Zur Auswertung wurde die Beckman System Gold Software Version 6.01 (Beckman, München) herangezogen. Als mobile Phase diente eine Mischung aus Natriumacetat-Puffer (22 mM) (Merck KGaA, Darmstadt) und Methanol HPLC-Qualität (Fisher Scientific GmbH, Schwerte) im Verhältnis 3 zu 2, die mit Essigsäure (J.T. Baker, VA Deventer, Niederlande) auf pH 3,38 eingestellt wurde. Die Retentionszeit von ALA betrug ca. 8 min bei einer Flussrate von 1,3 ml/min. Mit einem Korrelationskoeffizienten  $R^2 > 0,999$  über einen Konzentrationsbereich zwischen 1,0 und 500 µg/ml ALA war die Proportionalität zwischen Peakfläche und Arzneistoffkonzentration gegeben.

### **3.2.9.2 HPLC-Analytik von Lidocain**

Die chromatographische Bestimmung von Lidocain erfolgte mit einer HPLC-Anlage der Firma Waters (Eschborn), die aus einem HPLC-Pumpensystem (Typ 600 Controller), einem Autosampler (Typ 717plus) und einem UV-Detektor (tunable absorbance detector Typ 486) mit Deuteriumlampe bestand. Die Auswertung wurde mithilfe der Waters Millennium 32 Chromatography Manager Software durchgeführt. Auf die Säule (125 x 4 mm) wurden 20 µl Probe aufgetragen. Diese war mit Grom-Sil 120 ODS 3-CP 5 µm (Grom, Herrenberg-Kayh) gepackt. Als mobile Phase wurde eine Mischung aus 80 Teilen Wasser, das mit 0,05 % Triethylamin p.a. (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) versetzt und mit Essigsäure auf pH 4,0 eingestellt wurde, und 20 Teilen Acetonitril (Fisher Scientific GmbH, Schwerte) verwendet. Die Retentionszeit von Lidocain betrug ca. 4,5 min. Die Detektion erfolgte UV-metrisch bei einer Wellenlänge von 220 nm. Der Korrelationskoeffizient lag bei  $R^2 > 0,999$  über einen Kalibrierbereich zwischen 0,5 – 500 µg/ml.



### **3.2.11 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)**

Untersuchungen mittels Dynamischer Differenzkalorimetrie (Differential scanning calorimetry, DSC) wurden durchgeführt, um energetische Vorgänge, die während des Erhitzens oder des Abkühlens einer Substanz auftreten, zu untersuchen bzw. um die Temperaturen zu bestimmen, bei denen diese Vorgänge ablaufen [Europäisches Arzneibuch, 2008]. So wurden im Rahmen dieser Arbeit der Schmelzpunkt verschiedener POX-Chargen ermittelt sowie Interaktionen von wirkstofffreien und wirkstoffhaltigen Grundlagen mit SC untersucht. Für die Kalibrierung beider DSC-Anlagen wurden Indium und Zinn verwendet.

#### **3.2.11.1 Ermittlung des Schmelzpunktes**

Für die Ermittlung des Schmelzpunktes wurde ein Differential Scanning Calorimeter DSC 220 C mit einer Diskstation SSC 5200 H (Seiko Instruments, Kyoto, Japan) eingesetzt. Die Proben (5-6 mg) wurden in fest verschlossene Aluminiumtiegel eingewogen (Sartorius Supermicro S4-Waage, Sartorius AG, Göttingen) und gegen einen leeren Referenztiegel vermessen. Es wurde mit einer Temperaturrampe von 0 – 100 °C mit einer Heizrate von 5 K/min und mit n = 3 gearbeitet. Für die Auswertung wurden die Onset-Temperaturen verwendet.

#### **3.2.11.2 Untersuchung von Interaktionen zwischen Stratum corneum und den Grundlagen**

Die Untersuchung der Interaktionen zwischen SC und Bestandteilen der Grundlagen erfolgte mit einem Mettler Toledo DSC1 STAR<sup>e</sup> System (Mettler, Schwerzenbach, Schweiz). Das SC wurde bei Raumtemperatur in einem mit gesättigter Kaliumchloridlösung befülltem Exsikkator für mindestens 48 h konditioniert, so dass sich im SC ein Wassergehalt von 20 % (m/m) einstellte [Winkler, 2005]. Das hydratisierte SC wurde mit den Grundlagen in Unguator-Kruken bei 37 °C für 30 min inkubiert. Nach sorgfältigem Entfernen von überschüssigen Resten wurden die behandelten SC-Stücke in Aluminiumtiegel überführt und fest verschlossen. Die Einwaagen betrugen zwischen 10 und 20 mg. Die Proben wurden in einem Temperaturbereich zwischen 20 und 120 °C gegen einen leeren Referenztiegel

vermessen. Für die Auswertung, die mithilfe der STAR<sup>®</sup> Excellence Software erfolgte, wurde die Lage der Minima ( $n = 3$ ) berücksichtigt.

### **3.2.12 Kernspinresonanzspektroskopie (<sup>1</sup>H-NMR)**

Die Untersuchungen mittels Kernspinresonanzspektroskopie (<sup>1</sup>H-NMR) wurden mit einem Spektrometer DRX-400 (Bruker, Rheinstätten) bei 400 MHz und 20 °C durchgeführt. Die Proben wurden in Deuteriumoxid gelöst (Endkonzentration 71,4 mg/ml). Als Marker diente Trimethylsilylpropionsäure.

### **3.2.13 Infrarotspektroskopie (IR-Spektroskopie)**

Für die IR-Untersuchungen wurden Kaliumbromid-Presslinge verschiedener Poloxamere hergestellt. Diese wurden im Wellenlängenbereich zwischen 400 und 4000 cm<sup>-1</sup> mit dem Genesis Series FTIR<sup>™</sup> der Firma ATI Mattson (Madison, USA) untersucht.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Charakterisierung eines pseudoternären Mischungsdreiecks

#### 4.1.1 Makroskopische Charakterisierung

In diesem Kapitel wurden Untersuchungen an Systemen innerhalb des pseudoternären Mischungsdreiecks bestehend aus Wasser und festen Mischungsverhältnissen von POX und MIG (4:1) (m/m) und IPA und DMIS (1:1) (m/m) vorgenommen (Abbildung 3.1). Zuerst wurde eine makroskopische Charakterisierung durchgeführt, die sowohl die Konsistenz als auch die Homogenität der Systeme berücksichtigte. Dann wurde überprüft, ob sogenannte Ringing-Eigenschaften vorhanden waren.

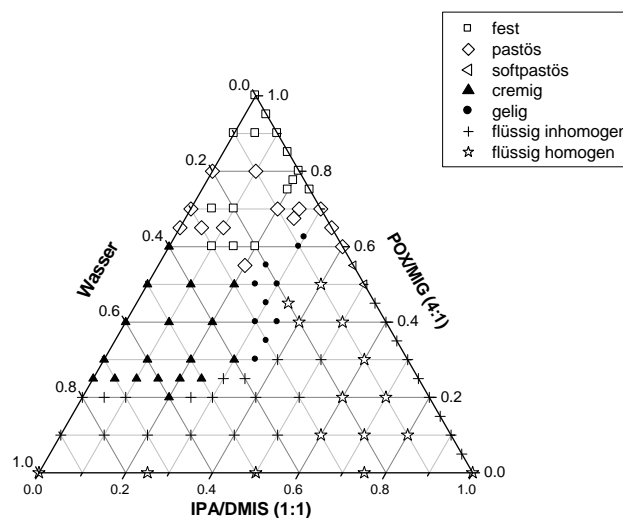


Abbildung 4.1: Makroskopische Charakterisierung der Konsistenz der hergestellten Systeme nach einem Tag Lagerung dargestellt in einem pseudoternären Mischungsdreieck [van Hemelrijck und Müller-Goymann, 2011]

Abbildung 4.1 zeigt das Mischungsdreieck mit den Konsistenzen der hergestellten Systeme einen Tag nach der Herstellung von flüssig über halbfest bis fest. Die als fest bzw. pastös bezeichneten Zubereitungen befanden sich bei hohen POX/MIG-Konzentrationen ( $\geq 55\%$ ). Dabei variierten die Gehalte von Wasser und von IPA/DMIS zwischen 0 und 40 %. Die festen Zubereitungen erschienen trocken und

hatten einen wachsähnlichen Charakter, während die pastösen Systeme eher feucht waren und gerade noch ausgestrichen werden konnten. Nicht nur die Konsistenz dieser Systeme war zu hoch für eine dermale Applikation aufgrund der relativ großen Anteile an POX und der relativ kleinen Anteile an flüssigen polaren Komponenten, die für die Quellung bzw. Auflösung der POX-Moleküle unzureichend waren, sondern es waren auch viele Inhomogenitäten vorhanden. Demzufolge waren solche Systeme ungeeignet für eine dermale Anwendung und wurden für die Untersuchungen in Kapitel 4.2 nicht berücksichtigt.

Cremige Formulierungen (Abbildung 4.1) waren weißlich und befanden sich bei mittleren POX/MIG- (20 – 60 %) und Wasserkonzentrationen (30 – 75 %) sowie zwischen 0 und 30 % IPA/DMIS. Die Formulierungen dieses Bereiches stellten sich als interessant heraus aufgrund der adäquaten Konsistenzen, des guten Spreitungsvermögens und der guten Homogenität. Die Zubereitungen, die als gelig bezeichnet wurden, befanden sich neben dem cremigen Bereich in der Mitte des pseudoternären Mischungsdreiecks und deckten eine sehr kleine Fläche ab (POX/MIG 30 – 62,5 %, IPA/DMIS 25 - 35 %, Wasser 7,5 - 35 %) (Abbildung 4.1). Sie waren im Gegensatz zu den cremigen Zubereitungen opaleszierend trüb bis klar, hatten eine hochviskose bis halbfeste Konsistenz und zeigten somit auch günstige Eigenschaften für die dermale Applikation. Für weitere Untersuchungen spielten diese Zubereitungen jedoch eine untergeordnete Rolle, denn das von Grüning (2007) entwickelte Thermogel, dessen Charakterisierung im Mittelpunkt dieser Arbeit steht, wies eine cremige Konsistenz auf.

Die größte Fläche innerhalb des Mischungsdreiecks wurde von flüssigen Systemen belegt, die in zwei Gruppen eingeteilt wurden. Die erste Gruppe setzte sich aus Zubereitungen zusammen, die instabil waren und Inhomogenitäten innerhalb von wenigen Stunden nach der Herstellung zeigten, während die zweite Gruppe aus Formulierungen bestand, die homogen waren und nach der Herstellung stabil blieben. Dabei war die Anzahl der inhomogenen Zubereitungen, die sowohl zwischen 10 - 30 % POX/MIG, 0 – 50 % IPA/DMIS und 20 - 90 % Wasser, als auch unterhalb von 50 % POX/MIG auf der wasserfreien Seite des Mischungsdreiecks lagen, größer als die der homogenen, die sich sowohl auf der POX/MIG-freien Seite des Mischungsdreiecks (Mischungen aus IPA, DMIS und Wasser waren in allen Mischungsverhältnisse homogen), als auch zwischen 10 - 50 % POX/MIG, 35 - 80 % IPA/DMIS und 10 - 30 % Wasser befanden (Abbildung 4.1). Da manche dieser

Formulierungen wegen der thermosensitiven Eigenschaften von POX [Schmolka, 1991; Tirnaksiz und Robinson, 2005] bei Körpertemperatur oder durch den Zusatz eines Arzneistoffes [Grüning, 2007] gelieren könnten, wurden einige für spätere Untersuchungen in Betracht gezogen. Außerdem lassen sich Arzneistoffe in flüssigen niedrigviskosen Formulierungen besser einarbeiten.

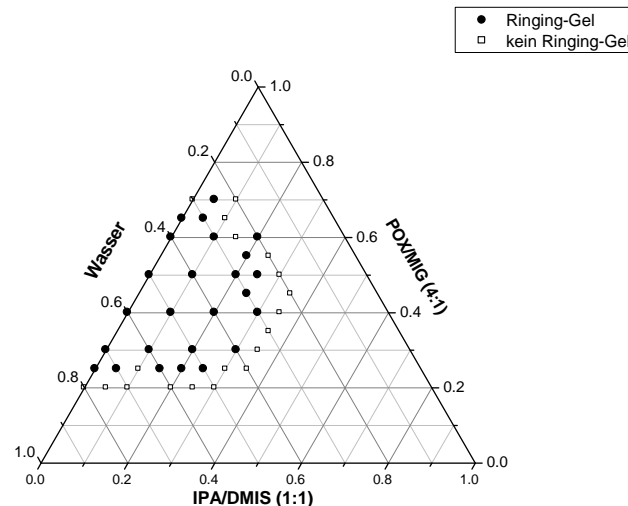


Abbildung 4.2: Darstellung des Bereiches der Zubereitungen mit Ringing-Gel Eigenschaften [van Hemelrijck und Müller-Goymann, 2011].

Das Vorhandensein von Ringing-Gel-Eigenschaften gibt einen Hinweis auf die Anwesenheit kubisch flüssigkristalliner Strukturen [Bauer et al., 2006]. Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden in Abbildung 4.2 dargestellt. Aus diesem Diagramm ließ sich erkennen, dass im mittleren Bereich des Mischungs-dreiecks (25 - 70 % POX/MIG, 0 - 30 % IPA/DMIS und 20 - 75 % Wasser) Zubereitungen mit Ringing-Gel-Eigenschaften vorhanden waren. Dieser Bereich stimmte fast genau mit dem des cremigen Bereiches von Abbildung 4.1 überein, wobei auch Zubereitungen anderer Gruppen (gelig, pastös, fest) mitenthalten waren. Da das ursprünglich entwickelte Thermogel ebenfalls ein Ringing-Gel mit vermutlich kubisch flüssigkristallinen Eigenschaften darstellte, wurde dieses Phänomen mit großem Interesse verfolgt. Die verbesserte Permeation von ALA könnte mit der Anwesenheit flüssigkristalliner Strukturen erklärt werden, da in der Literatur ein Zusammenhang zwischen Permeationsverbesserung und flüssigkristalliner Struktur beschrieben wird [Müller-Goymann, 2004; Lopes et al., 2006].

## 4.1.2 Mikroskopische Charakterisierung

### 4.1.2.1 Polarisationsmikroskopie (PolMik)

Gemäß Literatur sind Systeme auf POX-Basis in der Lage, verschiedene flüssigkristalline Strukturen auszubilden [Holmqvist et al., 1998; Ivanova et al., 2002]. Mithilfe der Polarisationsmikroskopie (PolMik) kann die optische Aktivität eines Systems untersucht werden und somit eine Aussage getroffen werden, ob Isotropie oder Anisotropie vorhanden sind. Letzteres wäre ein Hinweis auf das Vorhandensein eines kristallinen oder flüssigkristallinen (lamellaren oder hexagonalen) Ordnungsprinzips.

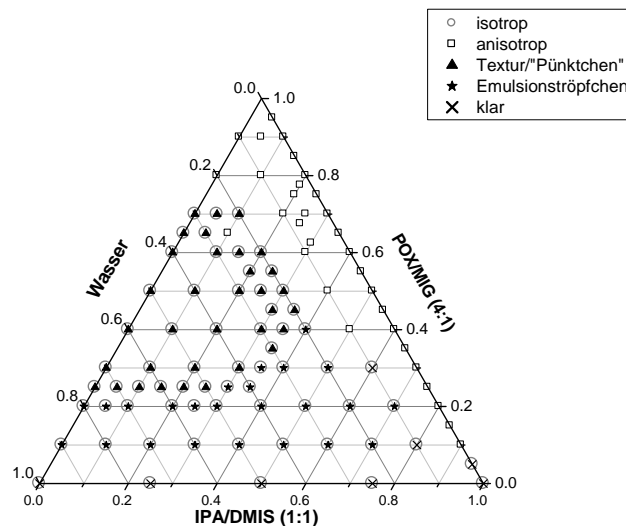


Abbildung 4.3: Polarisationsmikroskopische Untersuchung der Systeme einen Tag nach der Herstellung [van Hemelrijck und Müller-Goymann, 2011].

In Abbildung 4.3 wurden die Ergebnisse der PolMik-Untersuchungen einen Tag nach der Herstellung in einem pseudoternären Mischungsdiagramm dargestellt. Wie dem Mischungsdiagramm zu entnehmen ist, wurde eine große Anzahl an isotropen Systemen gefunden. Diese Eigenschaft schien in Zusammenhang mit dem Wassergehalt zu stehen, denn ab einem Gehalt von 20 % Wasser bei POX/MIG Konzentrationen  $> 35\%$  waren nur isotrope 5-Komponenten Systeme detektierbar mit Ausnahme von POX6510, das 25 % Wasser enthielt und anisotrop war. Bei niedrigeren POX/MIG-Konzentrationen ( $< 35\%$ ) waren sogar nur 10 % Wasser ausreichend, um Anisotropie zu verhindern.

Der Bereich mit anisotropen Systemen belegte eine viel kleinere Fläche in Abbildung 4.3 und beinhaltete Formulierungen mit unterschiedlichem Aussehen der vorhandenen Texturen (Abbildung 4.4 A-C). Hohe POX/MIG-Konzentrationen führten zu großen Strukturen, die flächendeckend zu beobachten waren (Abbildung 4.4 C). Eine Erniedrigung des POX/MIG-Gehaltes bzw. eine Erhöhung des IPA/DMIS-Gehaltes führte zu kleineren, nicht flächendeckenden Kristalliten (Abbildung 4.4 B). Erst bei einem Gehalt von 95 % kam es zum Verschwinden der Kristallite, was daraufhinweist, dass die Mischung aus IPA und DMIS ein schlechteres Lösungsmittel für POX als Wasser ist. Laut Herstellerangaben (BASF) ist POX jedoch in IPA löslich, daher ist die schlechte Löslichkeit auf das Vorhandensein von DMIS zurückzuführen. Parallel zu der POX/MIG-IPA/DMIS-Achse des Mischungs-dreiecks bei 10 % Wasser konnte ein ähnliches Phänomen beobachtet werden. Bei hohen POX/MIG-Konzentrationen ( $\geq 70\%$ ) war die Konsistenz der Proben so fest, dass die Proben nicht ausreichend dünn für das Mikroskopieren ausgestrichen werden konnten. Trotzdem konnte festgestellt werden, dass anisotrope Texturen flächendeckend vorhanden waren. Unterhalb einer Konzentration von 60 % POX/MIG wurden die anisotropen Texturen kleiner und weniger und unterhalb von 30 % POX/MIG verschwanden sie, wobei schon eine kleine Menge an Wasser (10 %) die Löslichkeit von POX deutlich verbesserte.

Die POX/MIG-Wasser Seite des pseudoternären Mischungs-dreiecks zeigte ebenfalls Systeme mit unterschiedlichen mikroskopischen Eigenschaften (Abbildung 4.4 D-F). So waren bei Konzentrationen unterhalb von 10 % POX/MIG große Tröpfchen zu

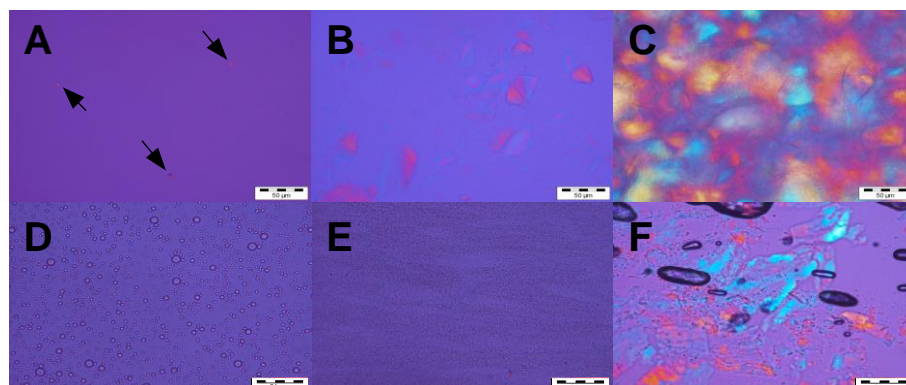


Abbildung 4.4: Strukturen, die unter dem Polarisationsmikroskop beobachtet wurden (A: POX1090, B: POX3070, C: POX5050, D: POX2000, E: POX3000, F: POX8000), die Pfeile zeigen sehr kleine POX Kristalle (Balken: 50 µm) [van Hemelrijck und Müller-Goymann, 2011].

erkennen (nicht als Abbildung dargestellt), die auf eine instabile Emulsion hindeuteten. Eine Erhöhung der POX/MIG-Konzentration (20 %) führte zu kleineren Tröpfchen (Abbildung 4.4 D) und weiterhin zu cremigen Zubereitungen (25 % < POX/MIG < 60 %), bei denen eine cremige Textur mit sehr kleinen Pünktchen erkannt wurde (Abbildung 4.4 E). Diese konnten aber auch in Zubereitungen mit höheren POX/MIG-Gehalten (bis zu 70 %), die den pastösen Zubereitungen zugeordnet wurden, beobachtet werden. Auf dieser Seite des Mischungsdiagramms wurde eine anisotrope Textur erst ab einer Konzentration von 80 % POX/MIG beobachtet (Abbildung 4.4 F). Die Texturen in diesem Bereich des Mischungsdiagramms waren aber nicht so stark ausgeprägt wie die auf der gegenüberliegenden Seite. Deswegen und aufgrund der Tatsache, dass die Strukturen erst bei sehr hohen POX- und folglich niedrigen Wasserkonzentrationen auftraten, könnte man schließen, dass Wasser bessere Lösungseigenschaften für POX/MIG hatte als IPA/DMIS (vergleiche Abbildung 4.4 C und E). Die dritte Seite des pseudoternären Mischungsdiagramms stellte homogene Mischungen aus IPA/DMIS und Wasser ohne POX/MIG dar und war deswegen von geringem Interesse für weitere Ausführungen.

Innerhalb des Mischungsdiagramms wurden viele Systeme beobachtet, die Tröpfchen zeigten (Abbildung 4.3). Diese stimmten mit dem Bereich der flüssigen Zubereitungen überein, wobei auch einige cremige und gelige Zubereitungen eingeschlossen waren. Die restlichen cremigen und geligen Zubereitungen zeigten das als cremige Textur mit Pünktchen bezeichnete Erscheinungsbild. Bei diesen Systemen waren die oben genannten Tröpfchen so klein geworden, dass sie nur noch als Pünktchen erkannt werden konnten. Außerdem wurden drei transparente, isotrope Systeme aus allen fünf Bestandteilen innerhalb des pseudoternären Mischungsdiagramms gefunden. Zwei von diesen befanden sich bei niedrigen POX/MIG-Konzentrationen (5 bzw. 10 %) und eine bei 30 % POX/MIG, 60 % IPA/DMIS und 10 % Wasser.

#### **4.1.2.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)**

Aufgrund der komplexen Präparation und des großen Zeitaufwandes konnten nicht alle Zubereitungen des Mischungsdiagramms mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht werden. Da das von Grüning entwickelte Thermogel



(POX2525) eine cremige Konsistenz und Ringing-Gel-Eigenschaften hatte, wurden hauptsächlich solche aber auch ein paar flüssige Zubereitungen in der näheren Umgebung von POX2525 untersucht. Bei allen untersuchten Zubereitungen konnte unabhängig von ihrer Konsistenz ein ähnliches Bild beobachtet werden: lipophile Tröpfchen, erkennbar an deren Textur, die von einem POX-Netzwerk umgeben waren (Abbildung 4.5). Die Größe der Tröpfchen variierte innerhalb einer Probe bzw. der untersuchten Systeme zwischen 100 und 1000 nm. Außer den beschriebenen Tröpfchen konnten keine charakteristischen kubisch flüssigkristallinen Strukturen nachgewiesen werden.

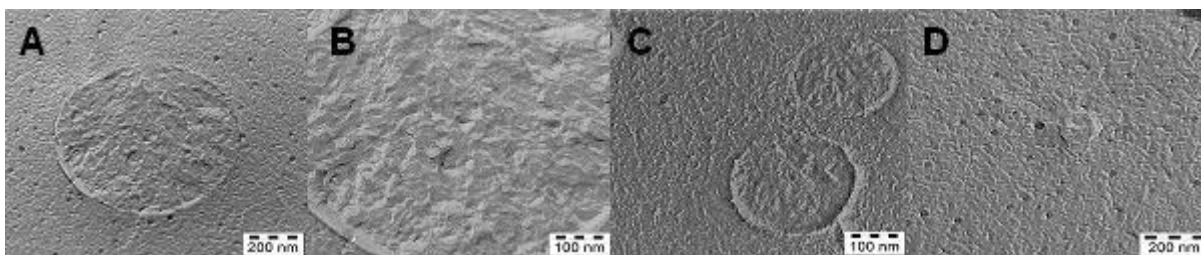


Abbildung 4.5: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von POX3023 (A und B), POX2525 (C) und POX2520 (D).

#### 4.1.3 Röntgenweitwinkelbeugung (WAXD)

Die Röntgenweitwinkeluntersuchungen (WAXD) entsprachen den Ergebnissen von PolMik und ermöglichten die Identifizierung des anisotropen Bereiches von Abbildung 4.3 als kristallin, da alle Zubereitungen in diesem Bereich mindestens einen Reflex zeigten. Diese Reflexe konnten mindestens einem der beiden Hauptreflexe von reinem POX bei 19 bzw. 23 °2 $\theta$  zugeordnet werden (Abbildung 4.6). Außerdem war eine deutliche Differenzierung zwischen röntgenamorphen und kristallinen Systemen möglich, die der mittels PolMik vorgenommenen Differenzierung zwischen isotropen und anisotropen Systemen entsprach. Proben mit kristallinen Anteilen befanden sich im Mischungsdreieck in Gegenwart niedriger Wassergehalte unter 10 %, bei hohen-POX/MIG-Konzentrationen ( $\geq 50$  %) und auf der wasserfreien Seite des Mischungsdreiecks bei Konzentrationen  $\geq 20$  % POX/MIG (Abbildung 4.7). Röntgenamorphe Systeme belegten die restliche Fläche des pseudoternären Mischungsdreiecks und zeichneten sich durch ein breites Signal aus. In amorphen Materialien sind sehr unterschiedliche Abstände zwischen den Molekülen vorhanden. Dieses führt zu einer sehr breiten Verteilung im

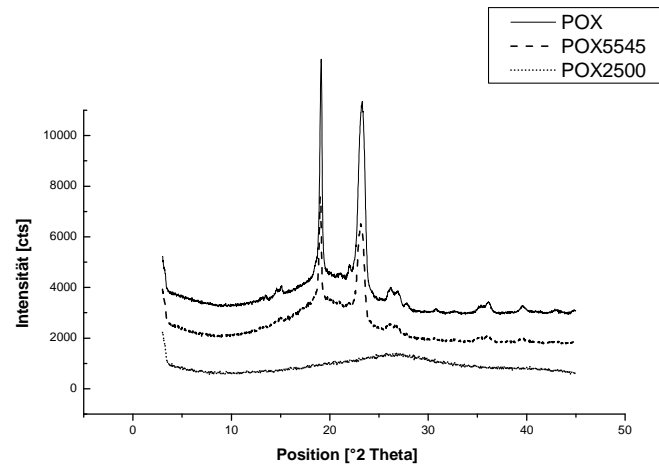


Abbildung 4.6: Röntgenweitwinkeldiffraktogramme von reinem Poloxamer 407 (POX) und zwei verschiedenen Zubereitungen: POX5545 (System mit kristallinen Anteilen) und POX2500 (röntgenamorphes System) [van Hemelrijck und Müller-Goymann, 2011].

Diffraktogramm in Form einer breiten Glockenkurve (Halo). Der Halo der röntgenamorphen Zubereitungen zeigte eine Verschiebung seines Intensitätsmaximums von 20 bis 28 °2  $\theta$  bei Erhöhung der Wasserkonzentration (Abbildung 4.8). Während reines Wasser einen amorphen Halo bei ca. 28 °2  $\theta$  aufwies, zeigten MIG und die Mischung aus IPA und DMIS (1:1) einen amorphen Halo bei ca. 20 °2  $\theta$ . Demzufolge ergab sich die Form und die Lage des röntgenamorphen Halos durch die Kombination der Halos der enthaltenen Hilfsstoffe. So enthielten die Zubereitungen mit einem Halo zwischen 26 und 28 °2  $\theta$  mindestens 55 % Wasser, während die Systeme mit einem Halo zwischen 19 und 20 °2  $\theta$  einen hohen Gehalt an MIG oder an IPA/DMIS aufwiesen (Abbildung 4.7).

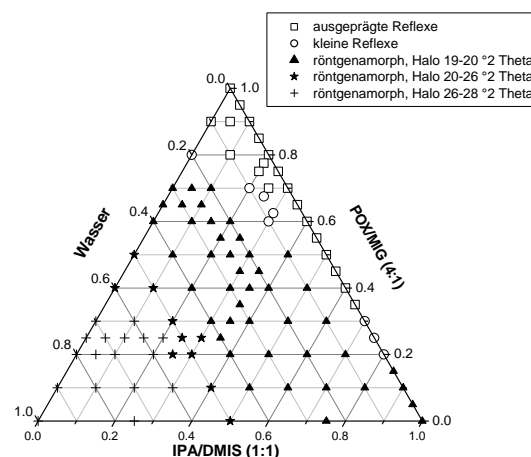


Abbildung 4.7: Ergebnisse der WAXD-Untersuchungen [van Hemelrijck und Müller-Goymann, 2011].

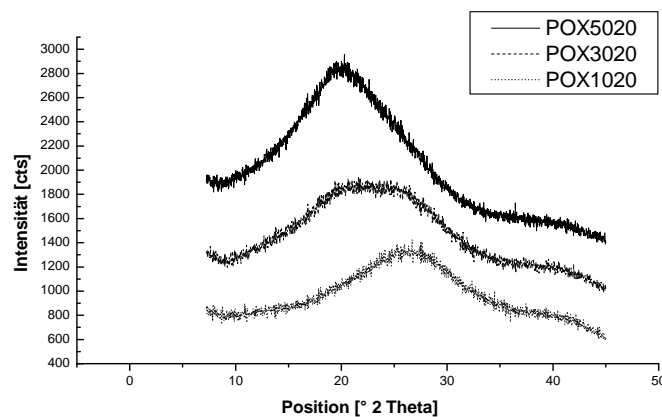


Abbildung 4.8: Röntgenweitwinkeldiffraktogramme von drei röntgenamorphen Systemen mit unterschiedlichen Wassergehalten. Der amorphe Halo verschiebt sich von kleinen zu großen Winkeln durch Zunahme des Wassergehaltes [van Hemelrijck und Müller-Goymann, 2011].

Die Berechnung der Kristallinität der wasserfreien Systeme bewies, dass diese umso kleiner wurde je höher der Gehalt an IPA/DMIS bzw. je kleiner der Gehalt an POX/MIG war. Dabei war der Wert für kristallines POX der Höchste (33,89 %). Dieser unerwartet niedrige Wert entstand aufgrund der von der Software erstellten Basislinie, die für die Berechnung zugrunde gelegt wurde. Die Fläche unter dieser Kurve stellte die amorphen Anteile der Probe dar und deutete somit auf einen hohen Anteil ungeordneter POX-Moleküle hin. Um die Kristallinitätsabnahme zu verdeutlichen, wurde der errechnete Wert für die Kristallinität von reinem POX gleich 1 gesetzt und somit eine relative Kristallinität für alle anderen Systeme mit kristallinen Anteilen berechnet. Die errechneten Werte für die quaternären Systeme sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Deutlich ist zu erkennen, dass der Wert für die relative Kristallinität immer kleiner wurde und mit 0,03 ein Minimum erreichte (POX2080). Wie in Abbildung 4.9 zu sehen ist, verhielt sich der Verlust an Kristallinität proportional zu der Konzentration an IPA/DMIS. Der Schnittpunkt der berechneten Ausgleichsgerade mit der x-Achse ergab einen Wert von ca. 83,5 % entsprechend einer Löslichkeit von POX in IPA/DMIS in Anwesenheit von MIG in der Größenordnung des per PolMik ermittelten Wertes (90 - 95 %). Der Unterschied zwischen diesen Werten lag an der unterschiedlichen Empfindlichkeit beider Methoden, die in der Literatur schon untersucht und kommentiert wurde, wobei PolMik sich als die empfindlichere von beiden herausstellte [Latsch et al., 2004].

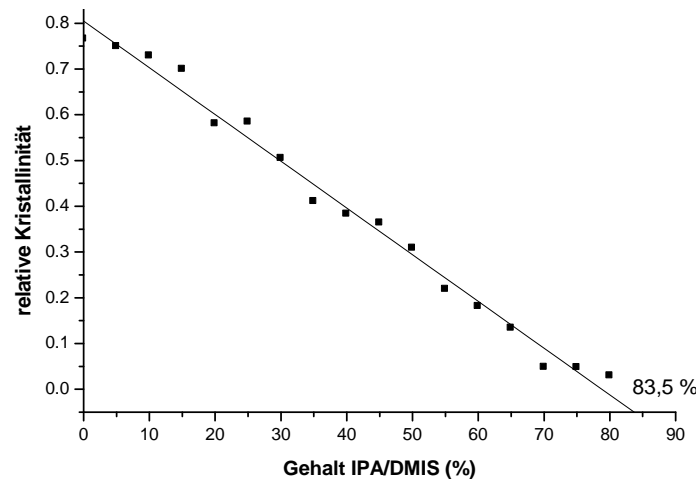


Abbildung 4.9: Korrelation zwischen dem Gehalt an IPA/DMIS und der relativen Kristallinität der quaternären Systeme aus POX, MIG, IPA und DMIS [van Hemelrijck und Müller-Goymann, 2011].

Tabelle 4.1: Errechnete und relative Kristallinität von reinem Poloxamer 407 (POX), POX/MIG (4:1) und wasserfreien quaternären Systemen aus POX, MIG, IPA und DMIS [van Hemelrijck und Müller-Goymann, 2011].

Zubereitung	Kristallinität [%]	relative Kristallinität
POX	33,89	1,00
POX/MIG (4:1)	25,94	0,77
POX9505	25,38	0,75
POX9010	24,69	0,73
POX8515	23,70	0,70
POX8020	19,67	0,58
POX7525	19,80	0,58
POX7030	17,10	0,50
POX6535	13,92	0,41
POX6040	12,97	0,38
POX5545	12,33	0,36
POX5050	10,46	0,31
POX4555	7,40	0,22
POX4060	6,14	0,18
POX3565	4,52	0,13
POX3070	1,63	0,05
POX2575	1,62	0,05
POX2080	1,00	0,03

Dass die Mischung aus IPA/DMIS weniger gute Lösungseigenschaften für POX als Wasser zeigt, wird in Abbildung 4.10 und Tabelle 4.2 verdeutlicht. Eine Erhöhung des Wassergehalts bei Zubereitungen mit 90, 80 und 70 % POX/MIG führte erwartungsgemäß zu einer Erniedrigung der relativen Kristallinität. Während es bei

Systemen mit 90 % POX/MIG durch eine Erhöhung des Wassergehaltes von 0 auf 10 % zu einer Abnahme von 0,73 auf 0,46 kam, erlitten Zubereitungen mit 80 % POX/MIG eine Abnahme der relativen Kristallinität von 0,58 auf 0,07 bei einer Erhöhung des Wassergehaltes auf 20 %. Schließlich konnte bei Zubereitungen mit 70 % POX/MIG eine dramatische Abnahme der relativen Kristallinität von 0,50 auf 0,09 % durch eine geringe Erhöhung der Wasserkonzentration (10 %) beobachtet werden.

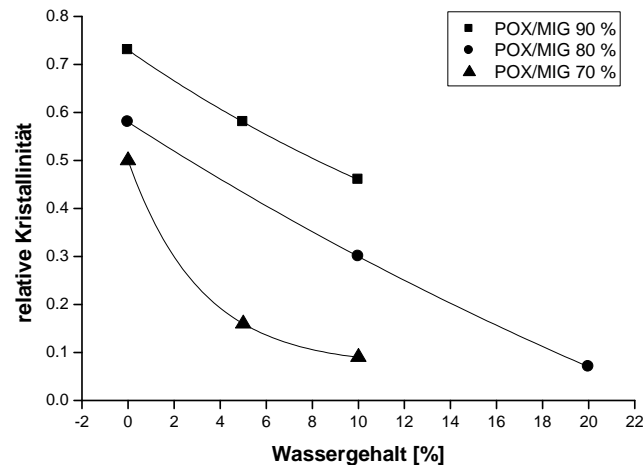


Abbildung 4.10: Korrelation zwischen dem Wassergehalt und der Kristallinität von Systemen mit 90 %, 80 % und 70 % POX/MIG [van Hemelrijck und Müller-Goymann, 2011].

Tabelle 4.2: Einfluss von Wasser auf die errechnete und die relative Kristallinität anisotroper Systeme komplexer Zusammensetzung [van Hemelrijck und Müller-Goymann, 2011].

Zubereitung	Wassergehalt [%]	Kristallinität [%]	relative Kristallinität
POX9010	0	24,69	0,73
POX9005	5	19,51	0,58
POX9000	10	15,61	0,46
POX8020	0	19,67	0,58
POX8010	10	10,18	0,30
POX8000	20	2,29	0,07
POX77,5/20	2,5	11,26	0,33
POX7520	5	7,29	0,22
POX7030	0	17,1	0,50
POX7025	5	5,37	0,16
POX7020	10	2,95	0,09
POX67,5/25	7,5	1,23	0,04
POX62,5/30	7,5	1,82	0,05
POX6030	10	1,45	0,04

#### 4.1.4 Rheologische Untersuchungen

Die cremigen und geligen Zubereitungen (s. 4.1.1, Abbildung 4.1) mit Ausnahme von POX6030 und POX62,5/30, deren Konsistenz als zu hoch für die dermale Applikation eingestuft wurde, wurden rheologisch untersucht. Außerdem wurden einige bei Raumtemperatur flüssige Zubereitungen mitberücksichtigt, um die Daten über die Bestimmung des Thermogelierungspunktes (TGP) zu vervollständigen.

##### 4.1.4.1 Bestimmung des linear viskoelastischen Bereiches (LVEB)

Die Festlegung eines für alle Zubereitungen geltenden linear viskoelastischen Bereiches war aufgrund der großen Konsistenzunterschiede der Zubereitungen bei Raumtemperatur (20 °C) nicht möglich. Bei 32 °C (Hauttemperatur) jedoch ließen sich die halbfesten Systeme in zwei Gruppen einteilen (Abbildung 4.11), wobei mit 0,5 Hz eine Frequenz gefunden wurde, die sich bei allen Systemen innerhalb des LVEB befand. Die erste Gruppe beinhaltete die Systeme mit 20, 25 und 30 % POX/MIG und 3 Systeme mit höheren POX/MIG-Konzentrationen (POX5025, POX5030 und POX5525). Diese drei geligen Zubereitungen waren wegen ihrer niedrigen Konsistenz bei der makroskopischen Charakterisierung aufgefallen. Mit

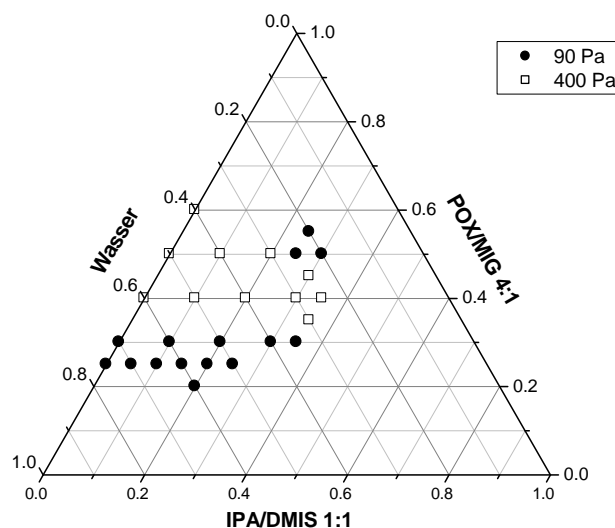


Abbildung 4.11: Linear viskoelastischer Bereich für halbfeste Zubereitungen bei 32 °C und 0,5 Hz.

90 Pa wurde eine Schubspannung ausgewählt, die sich bei manchen Zubereitungen entweder an der unteren oder an der oberen Grenze des LVEB befand (Tabelle 4.3). Die zweite Gruppe bestand aus den restlichen Zubereitungen: Systeme mit einem Gehalt zwischen 35 und 60 % POX/MIG (mit Ausnahme der drei oben erwähnten Zubereitungen), die einer Schubspannung von 400 Pa standhielten ohne Verlust ihres linear viskoelastischen Charakters. Bei diesen Systemen lag die ausgewählte Schubspannung eher im unteren Bereich des LVEB.

Tabelle 4.3: Rheologische Bestimmung des LVEB bei einer Frequenz von 0,5 Hz und einer Temperatur von 32 °C.

Zubereitung	Anfangswert des LVEB [Pa]	Endwert des LVEB [Pa]	Schubspannung für weitere Untersuchungen [Pa]
POX2020	10	100	90
POX2500	60	120	90
POX2505	50	150	90
POX2510	50	200	90
POX2515	50	200	90
POX2520	60	200	90
POX2525	20	270	90
POX3000	60	300	90
POX3010	90	500	90
POX3020	80	350	90
POX3030	90	500	90
POX3035	60	450	90
POX3535	100	550	400
POX4000	100	600	400
POX4010	200	1000	400
POX4020	130	900	400
POX4030	100	1200	400
POX4035	100	900	400
POX4530	100	1200	400
POX5000	250	2000	400
POX5010	250	2000	400
POX5020	150	2000	400
POX5025	50	450	90
POX5030	30	150	90
POX5525	20	300	90
POX6000	350	1600	400

#### 4.1.4.2 Charakterisierung der Konsistenz

Die Konsistenz halbfester Zubereitungen ist ein wichtiger Parameter sowohl für die dermale Applikation als auch für eine vollständige rheologische Charakterisierung. Für deren Bestimmung wurde wie in 3.2.4.2 beschrieben ein Frequenzsweep bei 90 bzw. 400 Pa durchgeführt und der Wert für den Phasenwinkel bei 0,5 Hz abgelesen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 4.12 und 4.13 dargestellt.

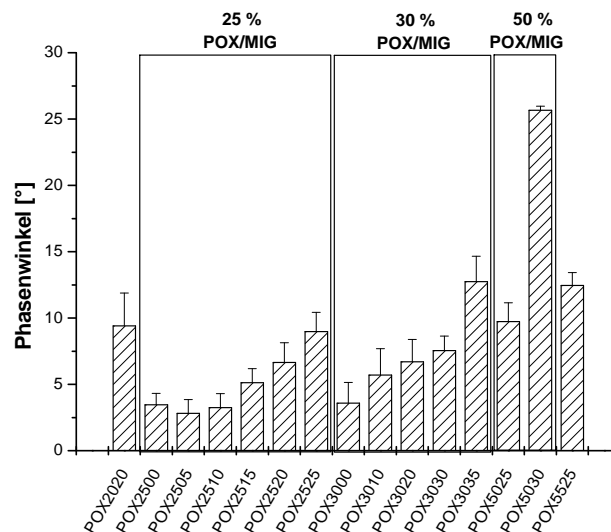


Abbildung 4.12: Rheologische Bestimmung der Konsistenz mittels eines Frequenzsweeps (90 Pa, 32 °C). Die dargestellten Werte wurden bei einer Frequenz von 0,5 Hz abgelesen (Mittelwert + Standardabweichung, n=3).

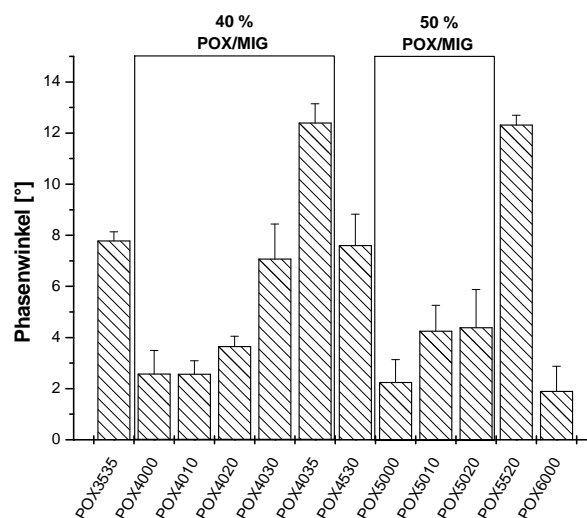


Abbildung 4.13: Rheologische Bestimmung der Konsistenz mittels eines Frequenzsweeps (400 Pa, 32 °C). Die dargestellten Werte wurden bei einer Frequenz von 0,5 Hz abgelesen (Mittelwert + Standardabweichung, n=3).



Betrachtet man die erste Gruppe mit 25 % POX/MIG in Abbildung 4.12, so erkennt man, dass trotz Erhöhung des IPA/DMIS-Gehaltes die Werte für die drei ersten Zubereitungen (POX2500, POX2505 und POX2510) sich ungefähr auf dem gleichen Niveau befinden. Erst ab einem Gehalt von 15 % IPA/DMIS kam es zu einer Erhöhung des Phasenwinkels und somit zu einer Verminderung der Konsistenz. Die Konsistenz der Zubereitungen wurde durch eine weitere Erhöhung des IPA/DMIS-Gehaltes immer niedriger und erreichte den flüssigen Zustand bei einem Gehalt von 30 % IPA/DMIS (s. POX2530 in Abbildung 4.1). Diese Tatsache deutete darauf hin, dass IPA/DMIS bis zu einem Gehalt von 10 % in das von POX in Wasser aufgebaute Netzwerk eingearbeitet werden konnte, ohne beträchtliche Unterschiede der Konsistenz zu verursachen. Ab 15 % IPA/DMIS konnten die beiden polaren Substanzen allerdings nicht mehr so gut inkorporiert werden, das aufgebaute Netzwerk wurde schwächer, und die Zubereitungen verflüssigten sich schließlich.

Die Gruppe mit 30 % POX/MIG (Abbildung 4.12) zeigte ebenfalls eine Abnahme der Konsistenz mit steigendem IPA/DMIS-Gehalt. In diesem Falle wurde aber schon bei einem Gehalt von 10 % IPA/DMIS ein deutlicher Anstieg des Phasenwinkels beobachtet. Zwischen 30 und 35 % IPA/DMIS konnte außerdem ein weiterer sprunghafter Anstieg des Phasenwinkels bestimmt werden, der mit dem Übergang zwischen cremigem und geligem Zustand übereinstimmte (Abbildung 4.1). Ab 40 % IPA/DMIS wurden die Zubereitungen flüssig (s. POX3040 in Abbildung 4.1).

Bei der Gruppe mit 40 % POX/MIG (Abbildung 4.13) wurde bis zu einem Gehalt von 10 % IPA/DMIS keine Veränderung der Konsistenz ermittelt. Erst ab 20 % IPA/DMIS kam es zu einem Anstieg des Phasenwinkels, dem zwei weitere sprunghafte Erhöhungen folgten (vergleiche Unterschied zwischen POX4020, POX4030 und POX4035). Diese deutliche Veränderung des Phasenwinkels stimmte ebenfalls mit dem Übergang zwischen cremigem und geligem Zustand überein (vergleiche Abbildung 4.1). Auch für diese Gruppe wurden die Zubereitungen ab einem Gehalt von 40 % IPA/DMIS flüssig (s. POX4040 in Abbildung 4.1).

Die Gruppe mit 50 % POX/MIG ist sowohl in Abbildung 4.12 als auch in Abbildung 4.13 vertreten. Beide Teilgruppen zeigten die gleiche Tendenz: eine Zunahme des Phasenwinkels durch die Erhöhung des IPA/DMIS-Gehaltes. Da diese Gruppe mit zwei verschiedenen Schubspannungen behandelt werden musste, wurde deutlich, dass die Zubereitungen mit höheren IPA/DMIS-Gehalten nur einer niedrigeren Belastung standhielten und somit eine niedrigere Konsistenz haben mussten.

Betrachtet man die Teilgruppen getrennt voneinander, so erkennt man in Abbildung 4.13, dass es hier schon mit 10 % IPA/DMIS zu einem deutlichen Anstieg des Phasenwinkels kam und dass danach zunächst keine weitere Steigerung zu erkennen war. Die andere, nur aus zwei Zubereitungen bestehende Teilgruppe (Abbildung 4.12) zeigte einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Phasenwinkeln. POX5030 war die Zubereitung mit dem vergleichsweise höchsten Phasenwinkel und wies somit die niedrigste Konsistenz auf. Für diese Teilgruppe wirkte sich die Behandlung mit einer niedrigen Schubspannung als sprunghafte Veränderung der Konsistenz aus. Makroskopisch waren diese beiden Zubereitungen als gelig charakterisiert worden, während die Systeme der ersten Teilgruppe (POX5000 – POX5020) ein cremiges Erscheinungsbild hatten. Insofern stimmte die unterschiedliche makroskopische Einordnung mit der unterschiedlichen für die Konsistenzmessung erforderlichen Schubspannung überein (vergleiche Abbildung 4.1). Auch bei 50 % POX/MIG wurde der flüssige Zustand mit 40 % IPA/DMIS erreicht (s. POX5040 in Abbildung 4.1).

Es konnte für jede Gruppe eine Abnahme der Konsistenz durch Erhöhung des IPA/DMIS-Gehaltes festgestellt werden. Der Grund hierfür könnte sein, dass sowohl IPA als auch DMIS in der Lage sind, Wasserstoffbrücken sowohl mit den PE-Ketten von POX als auch mit Wasser auszubilden. Dadurch würde die Hydratation und somit die Quellung der PE-Ketten erschwert werden. Damit wäre die von den POX-Mizellen besetzte Volumenfraktion in dem System kleiner und die Interaktionen zwischen den Aggregaten würden verringert werden [Wei et al., 2002]. Auf diese Weise könnte die Konsistenzabnahme erklärt werden.

#### **4.1.4.3 Bestimmung des Thermogelierungspunktes (TGP)**

Da POX-Zubereitungen eine thermoreversible Gelierung zeigen (unterhalb des TGP sind sie flüssig und oberhalb halbfest), bietet sich die Temperaturbestimmung des Gelierungspunktes (TGP) als charakteristische Größe an. Eine Bestimmung des TGP für die halbfesten Zubereitungen in Abbildung 4.1 war jedoch nicht für alle Zubereitungen möglich, weil Systeme mit mehr als 30 % POX/MIG einen TGP außerhalb des Meßbereiches hatten und daher nicht mit dem verwendeten Rheometer bestimmt werden konnten. Aus diesem Grund wurde der TGP nur für Systeme mit jeweils 20, 25 und 30 % POX/MIG bestimmt. Um die Messreihen zu

vervollständigen, wurden sowohl weitere halbfeste als auch flüssige Systeme hergestellt und untersucht (Tabelle 4.4).

Abbildung 4.14 zeigt den Zusammenhang zwischen dem TGP und dem POX/MIG- bzw. dem IPA/DMIS-Gehalt. Betrachtet man die Reihe mit 20 % POX/MIG, so erkennt man, dass zwischen 0 und 20 % IPA/DMIS der Wert des TGP von 28,75 °C auf 17,00 °C sinkt. Von 25 % IPA/DMIS aufwärts wurde eine Erhöhung des TGP beobachtet. Dieser erreichte bei 60 % IPA/DMIS einen Wert von 42,6 °C. Dabei zeigte diese Zunahme zwischen 20 und 30 % IPA/DMIS einen sprunghaftigen Verlauf und erreichte eine Art Plateau bei ca. 42 °C.

Tabelle 4.4: Zusammensetzung der für die Bestimmung des TGP eingesetzten Systeme und deren TGP. Die mit \* gekennzeichneten Zubereitungen zeigten eine Verflüssigung durch Einlagern bei -20 °C (Verflüssigungstemperatur im Gefrierschrank nicht bestimmbar).

Zubereitung	POX/MIG Gehalt [%]	IPA/DMIS Gehalt [%]	TGP [°C]	Standardabweichung
POX2000	20	0	28,75	1,34
POX2005		5	24,63	0,61
POX2010		10	21,70	0,36
POX2015		15	20,53	0,90
POX2020		20	17,00	1,26
POX2025		25	24,70	4,40
POX2030		30	35,45	5,69
POX 2040		40	38,05	3,18
POX 2050		50	38,80	4,51
POX 2060		60	42,60	4,64
POX2500	25	0	19,83	0,76
POX2505		5	18,00	0,90
POX2510		10	11,17	1,04
POX2515		15	10,08	0,38
POX2520		20	6,83	0,76
POX2525		25	8,83	1,15
POX2530		30	17,43	4,57
POX 2535		35	31,95	3,92
POX 2540		40	48,80	4,50
POX 2550		50	45,17	4,38
POX 2560		60	47,20	1,13
POX3000	30	0	15,33	0,14
POX3005		5	11,43	0,81
POX3007		7	8,00	0,77
POX3010		10	6,08	0,83
POX3020*		20	0,00*	-
POX3025*		25	0,00*	-
POX3030*		30	0,00*	-
POX3035		35	15,50	3,50
POX3040		40	34,20	2,12
POX3050		50	41,30	5,37
POX3060		60	44,10	3,39

Die Reihe mit 25 % POX/MIG zeigte einen sehr ähnlichen Verlauf mit einer anfänglichen Abnahme des TGP von 19,83 °C bei POX2500 auf 6,83 °C bei POX2520. Auch in diesem Fall stellte die Zubereitung mit 20 % IPA/DMIS das Minimum der Kurve dar. Von dieser Konzentration an und bis zu 40 % IPA/DMIS kam es zu einer schnellen Zunahme auf einen Wert von 48,8 °C. Eine weitere Erhöhung des IPA/DMIS- Gehaltes führte zum Einpendeln des TGP bei ca. 46 °C.

Die letzte Reihe mit 30 % POX/MIG zeigte ebenfalls einen ähnlichen Verlauf. Die Kurve für den TGP fing bei einem Wert von 15,33 °C (POX3000) an und sank dann zunächst mit steigendem Gehalt an IPA/DMIS. Ein Minimum war jedoch nicht rheologisch bestimmbar, weil die drei mit \* gekennzeichneten Zubereitungen (POX3020, POX3025 und POX3030) erst unterhalb von 0 °C flüssig wurden, wie sich durch mehrstündiges Einlagern bei –20 °C beobachten ließ. Nach ca. 30 min wurde eine Verflüssigung bei allen drei Systemen festgestellt, der mit weiterer Temperaturniedrigung ein Gefrieren folgte. Da die Temperatur der Verflüssigung nicht bestimmt werden konnte, wurden diese drei Systeme in Abbildung 4.14 mit einem TGP von 0 °C dargestellt. Ab 35 % IPA/DMIS kam es zu einem sprunghaftigen TGP-Anstieg, der sich bei einem Wert zwischen 42 und 43 °C einpendelte.

Die Verschiebung des TGP wässriger POX-Systeme zu niedrigeren bzw. höheren Temperaturen durch Zusatzstoffe ist in der Literatur ausführlich beschrieben und

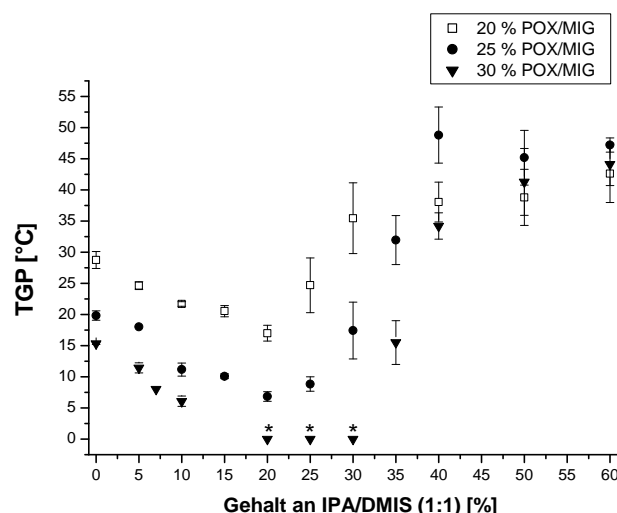


Abbildung 4.14: Abhängigkeit des TGP vom POX/MIG- und vom IPA/DMIS-Gehalt gemessen mit Hilfe der Oszillationsrheologie. Die mit \* gekennzeichneten Zubereitungen zeigten eine Verflüssigung durch Einlagern bei –20 °C (Verflüssigungstemperatur im Gefrierschrank nicht bestimmbar).

konnte mit der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) in Verbindung gebracht werden. Da die Mizellbildung den ersten Schritt des Gelierungsprozesses darstellt, können Stoffe, die die CMC beeinflussen, ebenfalls Einfluss auf die Gelierung haben [Pandit und McIntyre, 1997]. So würde eine Erniedrigung der CMC zu einer Erniedrigung des TGP und umgekehrt führen. Eine Erniedrigung des TGP kam zum Beispiel durch Einarbeitung von Salzen wie Natrium- und Kaliumchlorid [BASF, 2005] oder Natriumsulfat [Vadnere et al., 1984], von Konservierungsmitteln wie Benzoessäure und 4-Hydroxybenzoessäureethylester [Gilbert et al., 1987], aber auch von eher lipophilen Wirkstoffen wie Lidocain und Tetracain zustande [Sharma et al., 2008b]. Der Zusatz von Harnstoff, Natriumdodecylsulfat, Ethanol [Vadnere et al., 1984], Isopropanol [Pandit und McIntyre, 1997] und Polyethylenglykolen [Gilbert et al., 1987] führte hingegen zu einer Erhöhung des TGP.

Betrachtet man die 5-Komponenten Systeme als wässrige POX-Gele unter dem Einfluss von IPA, DMIS und MIG, so erkennt man, dass die Mischung aus den drei Hilfsstoffen bis ca. 20-25 % IPA/DMIS einen auf den TGP erniedrigenden Effekt hatte. In diesem Konzentrationsbereich war das Verhältnis von MIG/DMIS zu IPA relativ groß, so dass man vermuten könnte, dass die lipophilen Komponenten DMIS und MIG einen auf den TGP erniedrigenden Effekt hatten und dass dieser in diesem Konzentrationsbereich dem oben beschriebenen TGP-erhöhenden Effekt von IPA überlegen war.

Eine weitere Zugabe an IPA/DMIS führte zu einer Erhöhung des TGP. Diese könnte damit erklärt werden, dass das Verhältnis von MIG/DMIS zu IPA kleiner wurde, so dass der TGP-erhöhende Effekt von IPA dominierte.

Außerdem konnte aus Abbildung 4.14 ermittelt werden, dass der POX/MIG-Gehalt einen Einfluss auf den TGP hatte: je höher der Gehalt war, umso niedriger wurden die TGP. Dieses Phänomen war zu erwarten, da eine höhere Konzentration an POX die Anzahl an Mizellen im System erhöhte, so dass diese schneller miteinander interagieren und ein Gel ausbilden konnten [Wanka et al., 1994; Cabana et al., 1997]. Dieses Verhalten konnte bis zu einem Gehalt von 30 bzw. 35 % IPA/DMIS beobachtet werden. Bei höheren Gehalten im Plateaubereich war eine klare Unterscheidung zwischen den drei Gruppen nicht mehr möglich.

### **4.1.5 Stabilitätsuntersuchungen**

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Charakterisierung halbfester Zubereitungen ist deren Stabilität, da nur Zubereitungen, die über einen längeren Zeitraum stabil sind und unveränderte physiko-chemische Eigenschaften zeigen, problemlos für eine Vermarktung interessant sind. Daher sollen Stabilitätsuntersuchungen eine weitere Eingrenzung von Systemen ermöglichen. Die Stabilitätsuntersuchung erfolgte nach einem, drei, sechs, neun und zwölf Monaten. Dabei wurden die makroskopische Charakterisierung (3.2.3), die Polarisationsmikroskopie (3.2.4.1) sowie die Röntgenweitwinkeldiffraktometrie (3.2.6.1) angewendet, wobei für die erst genannte Methode alle Systeme untersucht wurden, während für die zwei weiteren jeweils 40 Systeme ausgewählt wurden.

#### **4.1.5.1 Makroskopische Charakterisierung**

Ausgehend von den Ergebnissen in Abbildung 4.1, die die Konsistenz und Homogenität der Systeme beschreibt, wurde die Veränderung dieser Eigenschaften in einem Zeitraum von zwölf Monaten beobachtet und in einem pseudoternären Mischungsdreieck (Abbildung 4.15) zusammengefasst dargestellt. Mehrheitlich zeigten die festen und pastösen Zubereitungen keinerlei Veränderungen. Lediglich eine dieser Zubereitungen (POX5520) verflüssigte sich nach neun Monaten Lagerung. Ein ähnliches Bild lieferten die cremigen Zubereitungen, von denen sich drei Systeme veränderten: POX2020 und POX3030 verflüssigten sich nach 6 Monaten, während POX2500 einen mikrobiellen Befall erlitt. Gelige Systeme erwiesen sich zum Teil als instabil: fast die Hälfte (vier von neun Zubereitungen: POX3035, POX3535, POX4035, POX4530) verflüssigte sich nach sechs Monaten Lagerung. Im flüssigen Bereich des Mischungsdreiecks traten bei den homogenen Zubereitungen kaum Veränderungen auf. Nur zwei dieser Systeme zeigten Inhomogenitäten innerhalb von zwölf Monaten. Die inhomogenen flüssigen Systeme waren entweder schon direkt nach der Herstellung oder spätestens nach einem Tag instabil und blieben so während der Lagerung. POX1000 und POX2000 wiesen außerdem nach drei Monaten einen mikrobiellen Befall auf.

Insgesamt wurde beobachtet, dass die meisten Systeme über den Lagerungszeitraum stabil waren. Die wenigen instabilen Zubereitungen zeigten drei Arten von Instabilitäten:

- Verflüssigung
- mikrobieller Befall
- neu auftretende Inhomogenitäten

Die Verflüssigung der Systeme könnte auf eine Alterung des von POX ausgebildeten Gelgerüsts zurückgeführt werden. Die flüssigen Bestandteile, die in diesem Netzwerk festgehalten wurden, konnten somit austreten. Da viele dieser Systeme eine relativ große Menge IPA/DMIS ( $> 30\%$ ) enthielten und dieses Lösungsmittelgemisch eher schlechte Lösungseigenschaften für POX hatte (4.1.3), könnte man dies als Grund für das Zusammenbrechen des POX-Gerüsts sehen. Obwohl dieses Phänomen in der Literatur nicht für POX beschrieben wurde, ist eine Synärese eine häufig auftretende Instabilität bei Hydrogelen, die dadurch gekennzeichnet ist, dass die Kapillarität des Gelgerüsts abnimmt. Daraus folgt, dass das Gelgerüst schrumpft und einen Teil der flüssigen Komponente abstößt [Bauer et al., 2006]. Die hier untersuchten Thermogele waren keine reinen Hydrogele, weil sie

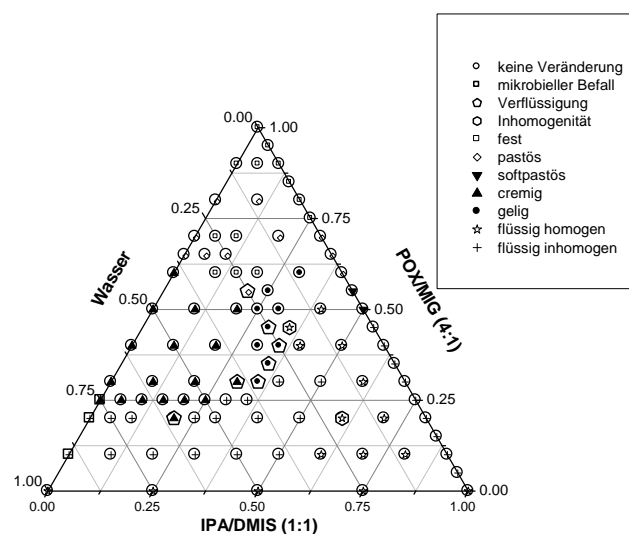


Abbildung 4.15: Makroskopische Charakterisierung nach einer Lagerung von zwölf Monaten dargestellt in einem pseudoternären Mischungsdiagramm.

auch eine lipophile Komponente enthielten. Aus diesem Grund könnte man sich eine Ostwald-Reifung (Wachstum von größeren Fetttröpfchen auf Kosten von kleinen) bzw. eine Koaleszenz vorstellen. Allerdings wurden keine koaleszierten Fetttröpfchen bei den instabilen Systemen beobachtet, so dass die Synärese als Grund für die beobachtete Instabilität in Frage kommt.

Bei den Zubereitungen, die mikrobiell befallen wurden, handelte es sich um Zubereitungen ohne IPA/DMIS. Das Fehlen von Isopropanol mit seinen konservierenden Eigenschaften machte sich dementsprechend bemerkbar. Der beobachtete mikrobielle Befall bestand aus schwarzen Kolonien, die auf *Aspergillus niger* hindeuteten. Dieser kommt im Erdboden vor und ist ein häufiger Schimmel auf verdorbenen Lebensmitteln. Außerdem kann dieser Erreger starken Temperatur und pH-Wert Schwankungen standhalten, ohne dass sein Wachstum gestört wird. Systeme mit höheren POX/MIG-Konzentrationen, die ebenfalls kein IPA/DMIS enthielten, waren zumindest makroskopisch mikrobiologisch stabil. Die höhere POX-Konzentration ( $\geq 30\%$ ) ermöglichte eine Konservierung der Systeme, die mit dem durch die Quellung von POX verbundenem Wasserentzug für die Mikroorganismen erklärt werden könnte. Auffällig war, dass schon sehr niedrige IPA/DMIS-Konzentrationen einen konservierenden Effekt ausübten. So gab es keine Zubereitung mit 5 % oder mehr IPA/DMIS, die über die gesamte Lagerzeit mikrobiologisch instabil war, obwohl eine konservierende Wirkung von IPA erst bei Konzentrationen von 15 % (V/V) gegeben ist. Es schien also, dass die Kombination der Hilfsstoffe für eine mikrobiologische Stabilität ausreichend war. Um genauere Aussagen über eine ausreichende Konservierung treffen zu können, müsste zum Beispiel die Prüfung auf ausreichende Konservierung des Europäischen Arzneibuches durchgeführt werden.

Die dritte Art der auftretenden Instabilitäten wurde als neu auftretende Inhomogenität bezeichnet. Anfänglich homogene Flüssigkeiten (nach 1 Tag Lagerung bei 20 °C) zeigten nach 12 Monaten Lagerung zwei Schichten bzw. Schlieren. Die beiden betroffenen Zubereitungen (POX2060 und POX4535) hatten ganz unterschiedliche Zusammensetzungen jedoch den gleichen Wassergehalt von 20 %. Eine Erklärung für die Instabilität in diesen Fällen konnte nicht gefunden und nicht auf die Konzentration der eingesetzten Hilfsstoffe zurückgeführt werden.



#### 4.1.5.2 Polarisationsmikroskopie

Die Ergebnisse der polarisationsmikroskopischen Untersuchungen nach einem Tag Herstellung wurden in Abbildung 4.3 dargestellt. Man konnte eine klare Grenze zwischen isotropen und anisotropen Systemen erkennen. Die Lagerungsuntersuchungen zeigten, dass drei verschiedene Arten von Instabilitäten – Verflüssigung, Zunahme bzw. Neuauftreten von Anisotropie - bei insgesamt acht Zubereitungen auftraten, während die meisten der 40 untersuchten Systeme stabil blieben. Eine Verflüssigung trat bei zwei cremigen Zubereitungen (POX2020 und POX3030) auf und war mikroskopisch an einem „Pünktchen“-Verlust der cremigen Struktur und dem Auftreten von größeren Tröpfchen erkennbar (Abbildung 4.17, A und B). Die Vergrößerung der Tröpfchen machte deutlich, dass die Zubereitungen einer Ostwald-Reifung unterlagen bzw. dass Koaleszenz aufgetreten war.

Als zweite Instabilität konnte eine Zunahme der Anisotropie bei POX2080, POX3070, und POX8000 beobachtet werden. Diese äußerte sich in einer Vergrößerung der unter dem Mikroskop auftretenden Texturen (Abbildung 4.17, C und D) bzw. in einer Flächenzunahme, die als Kristallwachstum interpretiert wurde: die schon direkt nach der Herstellung vorhandenen Texturen, die sich durch die WAXD-Untersuchungen als kristallin herausstellten, wuchsen während der Lagerung. Auffällig war, dass

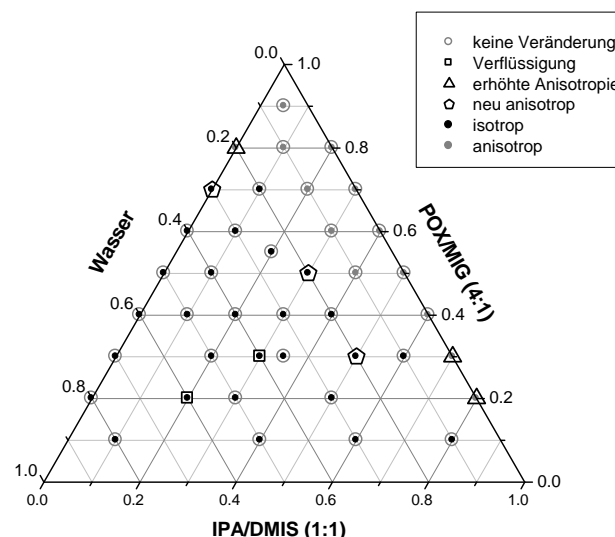


Abbildung 4.16: Stabilität der Systeme über zwölf Monate Lagerung untersucht mithilfe der Polarisationsmikroskopie.

dieses Kristallwachstum bei anderen anisotropen Systemen nicht beobachtet werden konnte. Dies lag wahrscheinlich daran, dass bei den letztgenannten Systemen von Beginn an bereits viele Kristallite in dichter Packung vorhanden waren, so dass das Auftreten neuer Kristallite oder deren Wachstum schwer erkannt werden konnte. Diese Annahme konnte damit untermauert werden, dass die Zubereitungen, die zunehmende Anisotropie zeigten, an der Grenze zwischen isotropen und anisotropen Zubereitungen lagen und somit direkt nach Herstellung eher wenige Kristallite aufwiesen, die erst während der Lagerung wuchsen.

Die dritte Art der Instabilitäten war eine bei drei Zubereitungen neu auftretende Anisotropie. Eine der drei Zubereitungen (POX7000) befand sich an der Grenze zwischen isotropen und anisotropen Systemen. In diesem Falle könnte man davon ausgehen, dass POX erst während der Lagerung auskristallisierte und die Kristalle anschließend wuchsen. Bei den beiden anderen Systemen (POX3050 und POX5030) war ebenfalls ein Auskristallisieren von POX zu beobachten. Diese beiden Systeme befanden sich nicht direkt an der Grenze zwischen isotropen und anisotropen Zubereitungen. Eine nicht auszuschließende Ursache für die Rekristallisation könnte eine Verdunstung flüchtiger Bestandteile bei der Lagerung sein, so dass sich die Zusammensetzung der Systeme verändern, sich die Löslichkeit von POX verschlechtern und schließlich POX auskristallisieren würde. Andererseits ist die Keimbildung ein stochastischer Prozess und für einen mehr oder weniger breiten Ostwald-Miers-Bereich verantwortlich, der übersättigte Lösungen erst möglich macht. Auf diese Weise könnte das sporadische Auftreten von rekristallisiertem POX in den genannten Systemen erklärt werden.

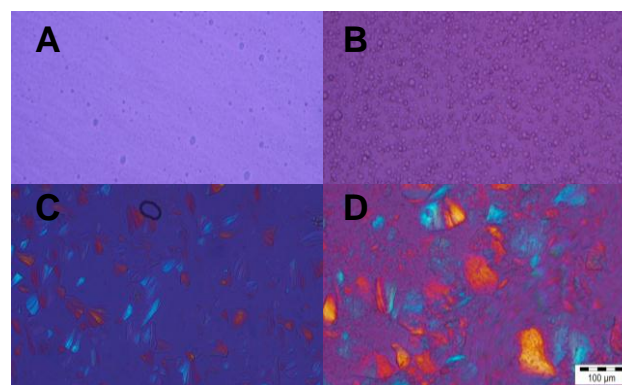


Abbildung 4.17: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen zweier Systeme, die Instabilitäten zeigten: Verflüssigung am Beispiel von POX 3030 (A, B), Zunahme der Anisotropie am Beispiel von POX 2080 (C, D) (Balken 100  $\mu\text{m}$ ).

#### 4.1.5.3 Röntgenweitwinkelbeugung (WAXD)

Die WAXD-Untersuchungen einen Tag nach der Herstellung waren im Einklang mit den Ergebnissen der Polarisationsmikroskopie und wurden bereits in Abbildung 4.7 dargestellt. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden 40 ausgewählte Systeme während einer Lagerung über zwölf Monate beobachtet. Während der Lagerung veränderte sich die Grenze zwischen röntgenamorphen und kristallinen Zubereitungen nicht. Diese blieb zwischen 10 und 20 % Wasser für hohe POX/MIG-Konzentrationen ( $> 50\%$ ) und zwischen 0 und 10 % für Systeme mit POX/MIG-Konzentrationen im Bereich zwischen 20 % und 50 % (Abbildung 4.18).

Innerhalb der röntgenamorphen Systeme wurden während der Lagerung keine Veränderungen festgestellt. Lage und Form des amorphen Halos blieben unverändert (Abbildung 4.19). Dies deutet darauf hin, dass die Zusammensetzung der Systeme während der Lagerung unverändert blieb, denn das Verdunsten einer Komponente hätte zu einer Verschiebung des amorphen Halos zu Gunsten der anderen Hilfsstoffe führen müssen (s. 4.1.3). Alle Systeme mit kristallinen Anteilen zeigten jedoch eine Erhöhung der Kristallinität über die Zeit (Abbildung 4.20). In Tabelle 4.5 sind deren Kristallinitäten und relativen Kristallinitäten (bezogen auf POX) dargestellt. Wie man aus dieser Tabelle erkennen kann, erfolgte die Kristallinitätszunahme unterschiedlich schnell. Für die wasserfreien Systeme auf der POX/MIG-IPA/DMIS-Seite des Mischungsdreiecks ergibt sich Abbildung 4.21, aus der man unterschiedliche Kristallinitätszunahmen über die Lagerzeit gut erkennen kann. Bei Zubereitungen mit niedrigen POX-Konzentrationen (20-30 % POX/MIG) erhöhte sich die relative Kristallinität in den ersten neun Monaten nur geringfügig. Erst nach zwölf Monaten konnte eine deutliche Zunahme der Kristallinität beobachtet werden. Insgesamt erhöhte sich diese über die gesamte Lagerung um das dreifache. Systeme mit mittleren POX-Konzentrationen (40-60 % POX/MIG) zeigten eine eher stetig zunehmende Kristallinität. Es gab keine sprunghafte Erhöhung. POX7030 und POX8020 zeichneten sich durch höhere POX-Gehalte aus und zeigten eine starke Zunahme der Kristallinität bereits nach dreimonatiger Lagerung. Danach fand zwar eine weitere aber nur noch geringfügige Zunahme statt. Die Unterschiede der Kristallinitätszunahme bei den verschiedenen POX-Konzentrationen könnten folgendermaßen erklärt werden: in Systemen mit niedrigen POX-Gehalten befand sich ein größerer Teil der POX-Moleküle im gelösten Zustand. Es gab also nur

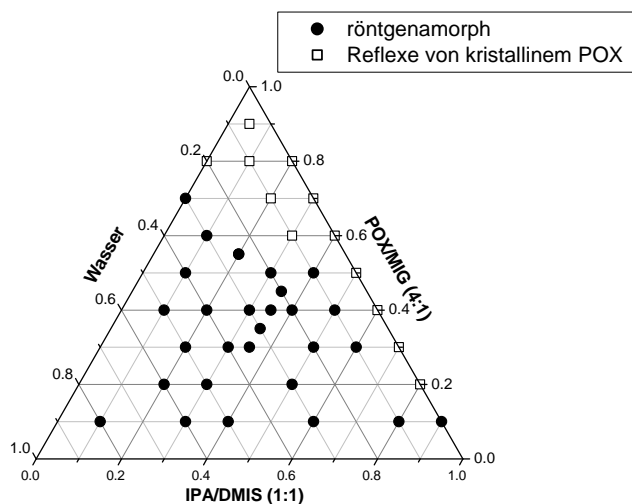


Abbildung 4.18: WAXD-Untersuchungen der Systeme über eine Lagerzeit von zwölf Monaten.

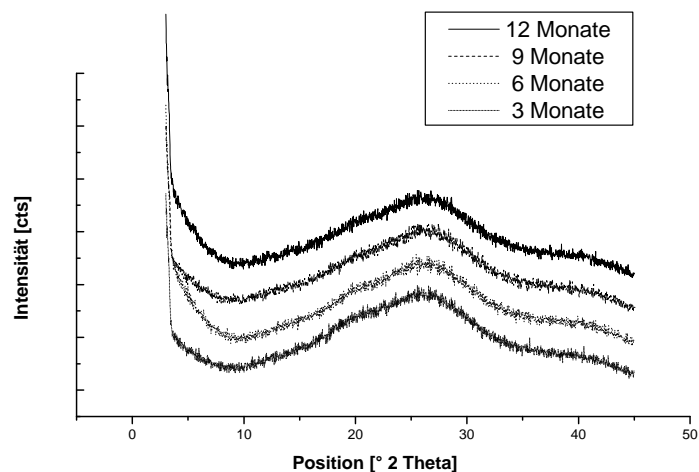


Abbildung 4.19: POX2020, eine röntgenamorphe Zubereitung, die keine Veränderung über die Zeit zeigte. Darstellung als Kaskadendiagramm.

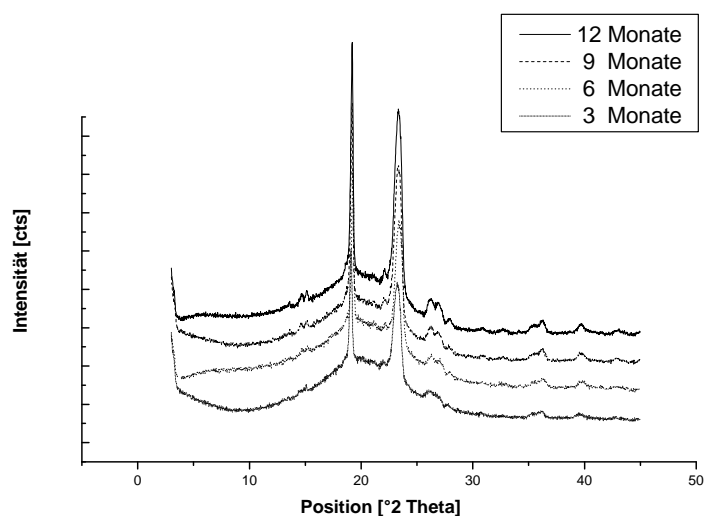


Abbildung 4.20: : Erhöhung der Kristallinität über die Zeit am Beispiel von POX5545. Darstellung als Kaskadendiagramm.

Tabelle 4.5: Zunahme der relativen Kristallinität während einer Lagerung von zwölf Monaten.

Zubereitung	relative Kristallinität bezogen auf reinem POX				
	1 Tag nach Herstellung	3 Monate	6 Monate	9 Monate	12 Monate
POX	1,00	-	-	-	-
POX 2080	0,03	0,04	0,04	0,05	0,10
POX 3070	0,05	0,06	0,07	0,09	0,15
POX 4060	0,18	0,19	0,20	0,21	0,23
POX 5050	0,31	0,32	0,35	0,36	0,37
POX 6030	0,04	0,06	0,09	0,10	0,10
POX 6040	0,38	0,38	0,41	0,41	0,44
POX 7020	0,09	0,17	0,18	0,26	0,33
POX 7030	0,50	0,59	0,62	0,63	0,65
POX 8000	0,07	0,15	0,22	0,19	0,24
POX 8010	0,30	0,30	0,36	0,44	0,51
POX 8020	0,58	0,69	0,69	0,71	0,73
POX 9005	0,58	0,71	0,74	0,80	0,83

wenige Kristalle, die als Kristallisationskeime dienen konnten. Erst nach neun Monaten lief die Kristallisation schneller ab, weil dann wahrscheinlich genügend Kristalle vorhanden waren, die durch weiteres Wachsen die Kristallinitätszunahme erklären. Bei mittleren POX-Gehalten waren von Beginn an genügend POX-Kristalle vorhanden, die durch Rekristallisation der gelösten POX-Moleküle kontinuierlich weiter wachsen konnten, so dass keine Sprünge zu erkennen waren. Im höheren Konzentrationsbereich begünstigten die zahlreichen POX-Kristalle deren Wachstum, das anfangs schnell ablief und sich einem maximalen Wert langsam annäherte, so dass am Ende der Beobachtungszeit nahezu alle POX-Moleküle auskristallisiert waren.

Die WAXD-Untersuchungen erlaubten allerdings nicht die Detektierung der mittels PolMik erkannten, neu aufgetretenen anisotropen Texturen. Dies deutete wieder darauf hin, dass die Empfindlichkeit von WAXD niedriger als die von PolMik ist [Latsch et al., 2004]. Nichtsdestotrotz war WAXD eine wichtige Methode, denn nur mit ihr konnte eine quantitative Bestimmung der Kristallinität durchgeführt und deren Zunahme ermittelt werden.

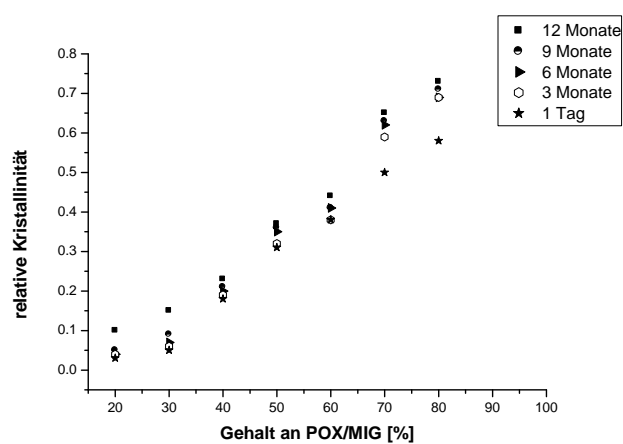


Abbildung 4.21: Unterschiedliche Geschwindigkeiten bei der Kristallinitätszunahme von Systemen mit steigendem POX-Gehalt.

## 4.2 Untersuchung des Einflusses der Komponenten auf ausgewählte physikochemische Eigenschaften

In Kapitel 4.1 konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung bzw. die Mengenverhältnisse der Komponenten zueinander einen großen Einfluss auf die physikochemischen Eigenschaften hatten. Für genauere Untersuchungen wurden wie in Abbildung 4.22 dargestellt drei verschiedenen Geraden durch das pseudoternäre Mischungsdreieck gezogen. Diese hatten ihren Ursprung in jeweils einer der Ecken des Mischungsdreiecks und als gemeinsamen Schnittpunkt die Rezeptur des von Grüning (2007) entwickelten Thermogels (POX2525). Eine wichtige Eigenschaft solcher Ursprungsgeraden ist, dass die Mischungsverhältnisse von zwei der drei Komponenten (in diesem Fall der zusammengesetzten Komponenten) konstant zueinander bleiben.

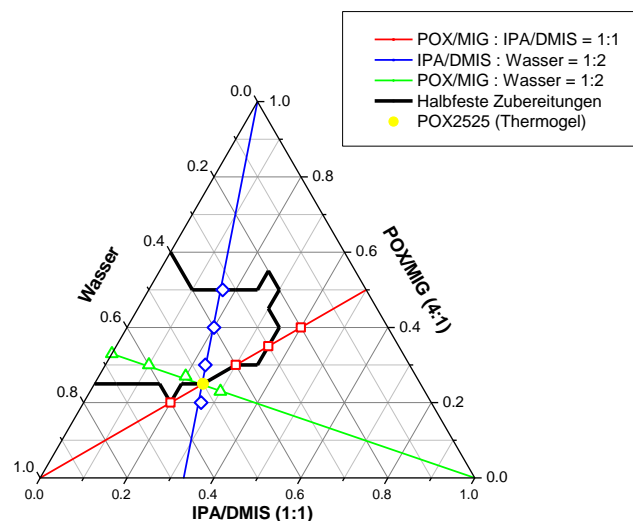


Abbildung 4.22: Versuchsdesign für die Untersuchung des Einflusses der Komponenten, halbester Bereich (bei Raumtemperatur) aus Abbildung 4.1 markiert.

Basierend auf der Rezeptur von POX2525 wurden so folgende Geraden konstruiert:

- eine Gerade mit einem festen Mischungsverhältnis von POX/MIG (4:1) zu IPA/DMIS (1:1) von 1:1.
- eine Gerade mit einem festen Mischungsverhältnis von IPA/DMIS (1:1) zu Wasser von 1:2 und
- eine Gerade mit einem festen Mischungsverhältnis von POX/MIG (4:1) zu Wasser von 1:2.

Die genaue Zusammensetzung der ausgewählten Systeme auf diesen Geraden ist in Tabelle 4.6 dargestellt. Es wurden nicht nur halbfeste Zubereitungen hergestellt, sondern auch flüssige, die an der Grenze zu den halbfesten Zubereitungen lagen. Auf diese Weise sollte untersucht werden, ob bzw. in welchem Ausmaß Konsistenzänderungen mit Änderungen anderer physikochemischer Parameter einhergehen. Wie in Kapitel 3.1 beschrieben wurden in diesem Kapitel Lutrol® F127 von BASF (LUT) als POX und das DMIS der Firma Croda (Arlasolve™ DMI) eingesetzt.

Tabelle 4.6: Zusammensetzung der Systeme entlang der markierten Geraden in Abbildung 4.22. Flüssige Systeme sind mit \* gekennzeichnet.

Zubereitung	Mischungsverhältnis entlang markierter Geraden in Abbildung 4.22	POX [%]	MIG [%]	IPA [%]	DMIS [%]	Wasser [%]
POX2020	POX/MIG:IPA/DMIS (1:1)	16	4	10	10	60
POX3030		24	6	15	15	40
POX3535		28	7	17,5	17,5	30
POX4040 *		32	8	20	20	20
POX2027 *	IPA/DMIS:Wasser (1:2)	16	4	13,5	13,5	53
POX3023		24	6	11,5	11,5	47
POX4020		32	8	10	10	40
POX5017		40	10	8,5	8,5	33
POX3300	POX/MIG:Wasser (1:2)	26,4	6,6	0	0	67
POX3010		24	6	5	5	60
POX2720		21,6	5,4	10	10	53
POX2330 *		18,4	4,6	15	15	47
POX2525	alle	20	5	12,5	12,5	50

#### 4.2.1 Rheologische Untersuchungen

Die rheologischen Untersuchungen wurden im Oszillationsmodus durchgeführt. Die in Kapitel 4.1.4.1 ermittelten Untersuchungsbedingungen für den LVEB (32 °C, 0,5 Hz und 90 bzw. 400 Pa in Gruppe 1 bzw. Gruppe 2) ließen sich nicht auf alle Zubereitungen übertragen. Die Untersuchung eines Systems (POX4040) musste mit 40 Pa Schubspannung variiert werden. Alle verwendeten Frequenzen und Schubspannungen sind in Tabelle 4.7 dargestellt und werden in den nachfolgenden Graphen nicht mehr vermerkt.



Tabelle 4.7: Einstellungen für die oszillationsrheologische Messung der Konsistenz. Die angegebenen Werte befinden sich innerhalb des LVEB der jeweiligen Zubereitung bei 32 °C.

Zubereitung	Mischungsverhältnis	Frequenz [Hz]	Schubspannung [Pa]
POX2020	POX/MIG:IPA/DMIS (1 :1)	0,5	90
POX3030			90
POX3535			90
POX4040			40
POX2027	IPA/DMIS:Wasser (1 :2)	0,5	90
POX3023			90
POX4020			400
POX5017			400
POX3300	POX/MIG:Wasser (1 :2)	0,5	400
POX3010			90
POX2720			90
POX2330			90
POX2525	alle	0,5	90

#### 4.2.1.1 Charakterisierung der Konsistenz

##### 4.2.1.1.1 Konsistenz der wirkstofffreien Zubereitungen

Die Konsistenz der wirkstofffreien Zubereitungen variierte, wie aus den makroskopischen Untersuchungen in 4.1.1 zu erwarten war, sehr stark. Betrachtet man Abbildung 4.23, so erkennt man für den Phasenwinkel und für die komplexe Viskosität der Systeme mit konstantem Verhältnis von POX/MIG zu IPA/DMIS (1:1) bei abnehmendem Wassergehalt (in Abbildung 4.23 von links nach rechts) Unterschiede im Kurvenverlauf: während die Werte für den Phasenwinkel sich für die vier ersten Zubereitungen (POX2020, POX2525, POX3030 und POX3535) auf nahezu gleichem Niveau befanden und erst bei der letzten (POX4040) ein deutlicher Anstieg zu erkennen war, stieg die komplexe Viskosität von POX2020 zu POX2525 zunächst deutlich an, blieb dann nahezu konstant, um dann für POX4040 stark abzufallen. Insgesamt zeigten aber beide Kurven die Konsistenzerniedrigung des Systems POX4040 mit einem Wassergehalt von 20 % bei einer Messtemperatur von 32 °C. Bei Temperaturabsenkung auf Raumtemperatur verflüssigte sich dieses System, das, wie schon erwähnt, mit einer geringeren Schubspannung

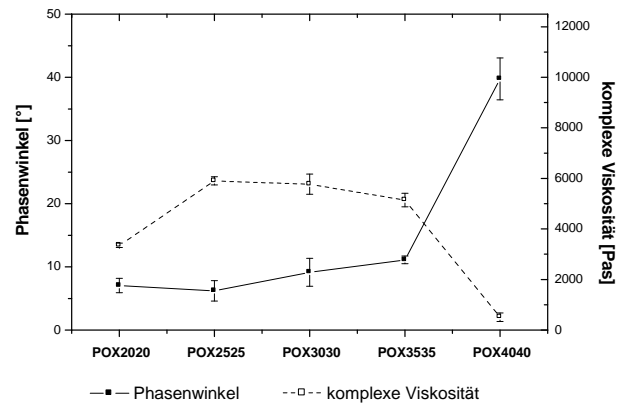


Abbildung 4.23: Phasenwinkel und komplexe Viskosität für die Systeme mit konstantem Verhältnis von POX/MIG zu IPA/DMIS (1:1). Der Wassergehalt nimmt von links nach rechts von 60, über 50, 40, 30 bis 20 % ab.

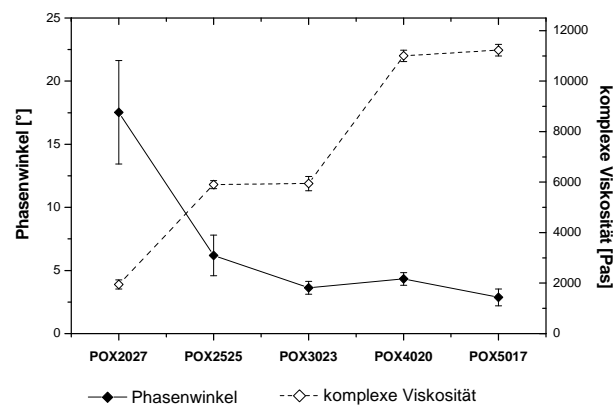


Abbildung 4.24: Phasenwinkel und komplexe Viskosität für die Systeme mit konstantem Verhältnis von IPA/DMIS zu Wasser (1:2). Der Wassergehalt nimmt von links nach rechts von 53, über 50, 47, 40 bis 33 % ab.

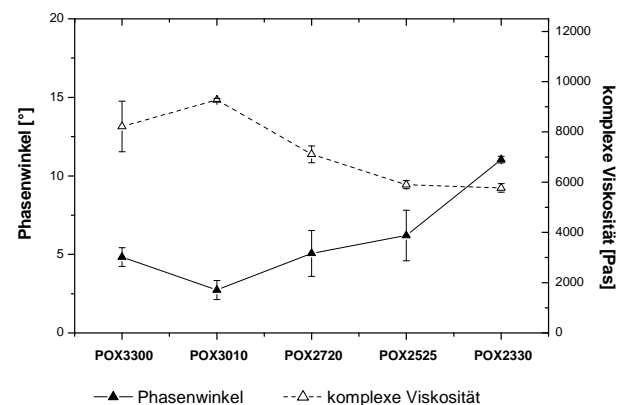


Abbildung 4.25: Phasenwinkel und komplexe Viskosität für die Systeme mit konstantem Verhältnis von POX/MIG zu Wasser (1:2). Der Wassergehalt nimmt von links nach rechts von 67, über 60, 53, 50 bis 47 % ab.

behandelt werden musste, weil der LVEB keine höhere Belastung bei 32 °C zuließ. Wahrscheinlich reichte die Wassermenge für eine ausreichende Hydratisierung von POX nicht aus um ein stabiles Gelgerüst aufzubauen. Die im Vergleich dazu große Menge an IPA/DMIS war nicht in der Lage die Quellung von POX zu fördern wegen der schon in Kapitel 4.1.3 besprochenen schlechteren Löslichkeit von POX in diesem Lösungsmittelgemisch im Vergleich zu Wasser.

Die komplexe Viskosität und der Phasenwinkel für die Systeme mit konstantem Verhältnis von IPA/DMIS zu Wasser (1:2) wurden in Abbildung 4.24 dargestellt. Auch hier konnte ein unterschiedlicher Verlauf beider Kurven erkannt werden. Dabei zeigte der Verlauf des Phasenwinkels einen deutlichen Abfall zwischen der ersten (POX2027) und den weiteren Zubereitungen, während der Anstieg der komplexen Viskosität eher stufenweise ablief, wobei sich POX2525 und POX3023 auf einem Niveau und POX4020 und POX5017 auf einem höheren Niveau befanden. Diese Ergebnisse waren zu erwarten, denn POX fungierte als Emulgator und Konsistenzgeber [BASF, 2005]. Außerdem befand sich der LVEB bei einer hohen Schubspannung (400 Pa), was auf eine hohe Konsistenz der Zubereitungen hinweist. Der vergleichsweise hohe Phasenwinkel und die niedrige komplexe Viskosität des Systems POX2027 bei 32 °C verdeutlichten die niedrige Konsistenz, die bei Temperaturabsenkung auf 20 °C zu einer Verflüssigung dieser Zubereitung führte.

Abbildung 4.25 zeigt den Phasenwinkel und die komplexe Viskosität für die Systeme mit konstantem Verhältnis von POX/MIG zu Wasser (1:2). In diesem Fall zeigten beide Kurven einen annähernd spiegelsymmetrischen Verlauf. Dabei nahm die komplexe Viskosität von POX3300 zu POX3010 zu bzw. der Phasenwinkel ab, so dass sich POX3010 als die Zubereitung mit der höchsten Konsistenz dieser Reihe herausstellte. Bei weiterer Erhöhung an IPA/DMIS fand eine stetige Erniedrigung der komplexen Viskosität bzw. eine Erhöhung des Phasenwinkels statt, so dass POX2330, die letzte Zubereitung der Reihe, die niedrigste Konsistenz zeigte. Es wird deutlich, dass 10 % IPA/DMIS zu einer höheren Konsistenz führte als das IPA/DMIS-freie System, das sogar mehr POX und Wasser enthielt.

#### 4.2.1.1.2 Konsistenz der Zubereitungen mit ALA

Grüning (2007) stellte mithilfe der Oszillationsrheologie fest, dass die Einarbeitung von ALA oder von Salzen wie Natriumchlorid einen Einfluss auf die Konsistenz von POX2525 hatte. Die Einarbeitung von ALA in 1 %iger Konzentration führte zu einem System, das schwerer zu deformieren war als POX2525, während mit 5 und 10 % ALA einfacher zu deformierende, weichere Zubereitungen entstanden. In den vorliegenden Untersuchungen wurde ALA in 10 %iger Konzentration in alle Zubereitungen eingearbeitet. Zur Charakterisierung der wirkstoffhaltigen Systeme wurde lediglich die komplexe Viskosität herangezogen, da sich dieser Parameter proportional zur Konsistenz verhält und somit der Zusammenhang einfacher darzustellen ist.

Die Veränderung der Konsistenz durch die Einarbeitung von ALA für die Formulierungen entlang der drei Geraden ist in den Abbildung 4.26, 4.27 und 4.28 dargestellt. Ein einheitlicher Effekt von ALA ist nicht zu erkennen. Für die Systeme mit konstantem Verhältnis von POX/MIG zu IPA/DMIS (1:1) und variierenden Wassergehalten (Abbildung 4.26) wurde für POX2020 und POX2525 eine leichte Konsistenzminderung gegenüber den ALA-freien und den ALA-haltigen wasserärmeren Formulierungen beobachtet, die eine höhere Konsistenz bei ALA-Zusatz im Vergleich zu den ALA-freien Zubereitungen aufwiesen.

Die Systeme mit konstantem Verhältnis von IPA/DMIS zu Wasser (1:2) ohne bzw. mit ALA (Abbildung 4.27) zeigten bei niedrigen POX/MIG-Gehalten kaum Unterschiede, während die Formulierungen mit höheren Konzentrationen an POX/MIG, eine höhere Konsistenz bei ALA-Zusatz im Vergleich zu den wirkstofffreien Systemen hatten.

Für die dritte Gruppe (Systeme mit konstantem Verhältnis von POX/MIG zu Wasser (1:2)) (Abbildung 4.28) waren kaum Unterschiede zwischen ALA-haltigen und ALA-freien zu beobachten. Bei POX3300, POX2525 und POX2330 verursachte die ALA-Einarbeitung eine geringe Konsistenzabnahme, während POX3010 und POX2720 eine Erhöhung der Konsistenz erfuhren. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen sind diese Konsistenzänderungen jedoch vernachlässigbar.

Für die zwei ersten Gruppen schien der konsistenzverändernde Effekt von ALA mit der enthaltenen Wassermenge zusammenzuhängen, denn in beiden Gruppen hatten Zubereitungen mit niedrigem Wassergehalt eine höhere Konsistenz. Ricci et al. (2002) behaupteten, dass die Zugabe von NaCl und NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> zu einer

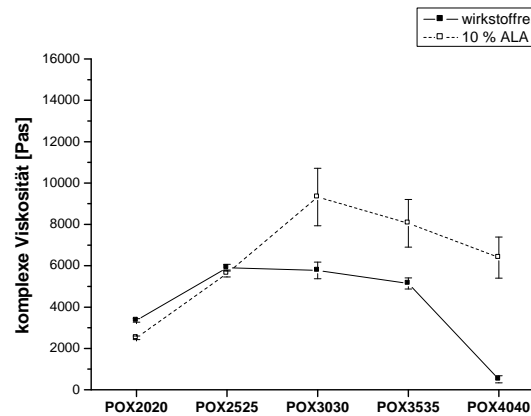


Abbildung 4.26: Vergleich der Konsistenzen der wirkstofffreien und der ALA-haltigen Systeme mit konstantem Verhältnis von POX/MIG zu IPA/DMIS (1:1). Der Wassergehalt nimmt von links nach rechts von 60, über 50, 40, 30 bis 20 % ab.

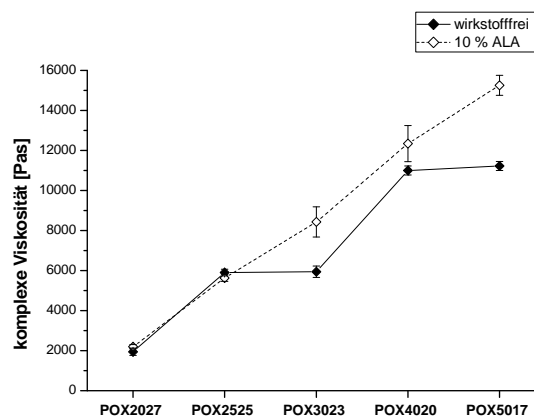


Abbildung 4.27: Vergleich der Konsistenzen der wirkstofffreien und der ALA-haltigen Systeme mit konstantem Verhältnis von IPA/DMIS zu Wasser (1:2). Der Wassergehalt nimmt von links nach rechts von 53, über 50, 47, 40 bis 33 % ab.

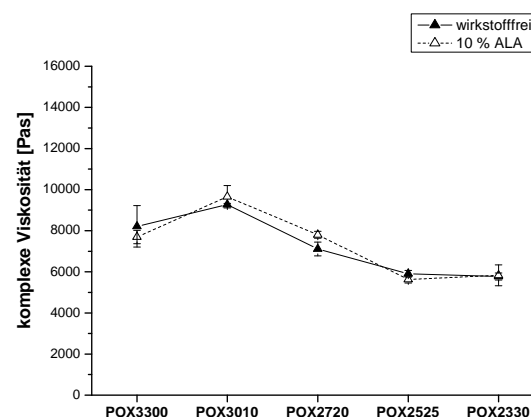


Abbildung 4.28: Vergleich der Konsistenzen der wirkstofffreien und der ALA-haltigen Systeme mit konstantem Verhältnis von POX/MIG zu Wasser (1:2). Der Wassergehalt nimmt von links nach rechts von 67, über 60, 53, 50 bis 47 % ab.

Konsistenzernhöhung von POX-Gelen führte. Diese Salze bilden im wässrigen Milieu Ionen, zu denen Wassermoleküle eine höhere Affinität haben als zu POX-Molekülen, so dass weniger freie Wassermoleküle für die gleiche Menge an POX zur Verfügung stehen und sich insgesamt eine höhere Konsistenz ergibt. Es könnte also sein, dass dieser Effekt bei Zubereitungen mit relativ geringen Wassergehalten stärker ausgeprägt war, während bei größeren Wassergehalten andere Effekte eine Rolle spielten, wie zum Beispiel der von Rose (1999) berichtete konsistenzmindernde Effekt bei der Wasserhaltigen Hydrophilen Salbe durch Zugabe von Natriumchlorid. Er begründete diesen mit einer räumlichen Trennung bzw. Trennung über ionische Wechselwirkungen, die durch die Anlagerung von NaCl an Gerüststrukturen zustande kam.

Bei der dritten Gruppe, bei der alle Zubereitungen eher große Mengen an Wasser enthielten, könnte es sein, dass sich der in 4.2.1.1.1 beschriebene konsistenzmindernde Einfluss durch Erhöhung der IPA/DMIS-Konzentration und der konsistenzernhöhende Effekt von ALA ausglich.

#### **4.2.1.1.3 Konsistenz der Zubereitungen mit Lidocain**

Die Veränderung der Konsistenz der untersuchten Zubereitung durch den Zusatz von 5 % Lidocain wurde in den Abbildung 4.29, 4.30 und 4.31 dargestellt. Auch hier konnte keine einheitliche Tendenz beobachtet werden. Die Systeme mit konstantem Verhältnis von POX/MIG zu IPA/DMIS (1:1) (Abbildung 4.29) zeigten aufgrund der relativ hohen Standardabweichungen der lidocainhaltigen Zubereitungen kaum Unterschiede im Vergleich zu den wirkstofffreien Grundlagen. Lediglich bei POX3535 konnte ein konsistenzmindernder Effekt von Lidocain festgestellt werden. Ein Grund für den im Rahmen dieser Untersuchungen weniger ausgeprägten Effekt von Lidocain gegenüber dem Effekt von ALA könnte sowohl die niedrigere Wirkstoffkonzentration (5 % Lidocain statt 10 % bei ALA), als auch die unterschiedliche Hydrophilie/Lipophilie sein. Eine kleine Menge lipophiles Lidocain kann nicht so starke Wechselwirkungen in einem wässrigen Milieu eingehen wie eine große Menge hydrophiles ALA.

In Abbildung 4.30 (Systeme mit konstantem Verhältnis von IPA/DMIS zu Wasser (1:2)) erkennt man, dass bei niedrigen POX/MIG-Konzentrationen (zwischen 20 und 30 %) Lidocain einen konsistenzernhöhenden Effekt hatte, während bei hohen

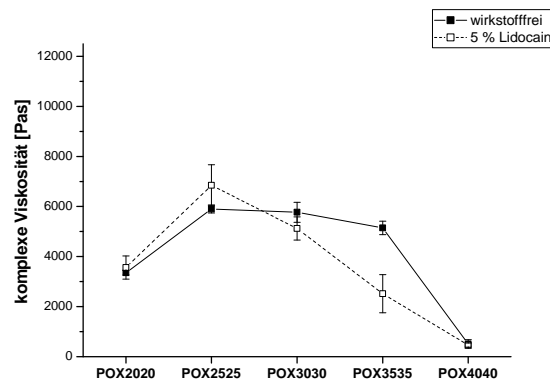


Abbildung 4.29: Vergleich der Konsistenzen der wirkstofffreien und der lidocainhaltigen Systeme mit konstantem Verhältnis von POX/MIG zu IPA/DMIS (1:1). Der Wassergehalt nimmt von links nach rechts von 60, über 50, 40, 30 bis 20 % ab.

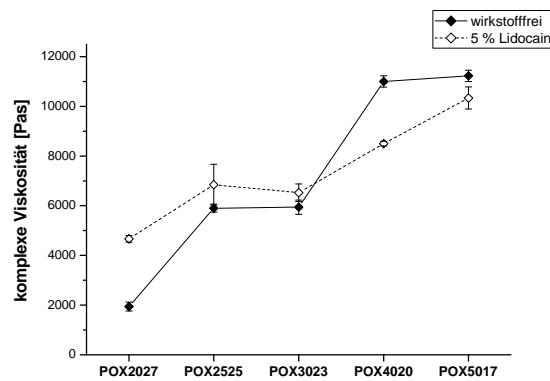


Abbildung 4.30: Vergleich der Konsistenzen der wirkstofffreien und der lidocainhaltigen Systeme mit konstantem Verhältnis von IPA/DMIS zu Wasser (1:2). Der Wassergehalt nimmt von links nach rechts von 53, über 50, 47, 40 bis 33 % ab.

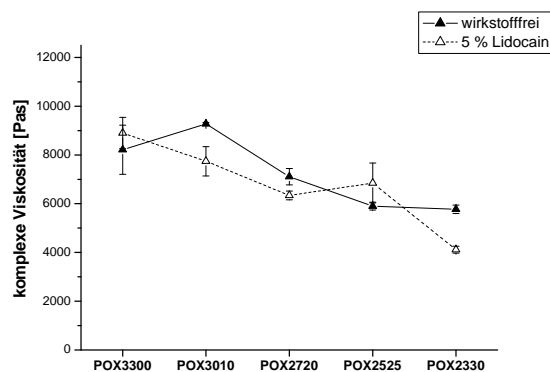


Abbildung 4.31: Vergleich der Konsistenzen der wirkstofffreien und der lidocainhaltigen Systeme mit konstantem Verhältnis von POX/MIG zu Wasser (1:2). Der Wassergehalt nimmt von links nach rechts von 67, über 60, 53, 50 bis 47 % ab.

POX/MIG-Konzentrationen von 40 und 50 %, ein konsistenzmindernder Effekt beobachtet wurde. Deutliche Konsistenzunterschiede zwischen Lidocain-haltigen und –freien Zubereitungen wurden jedoch nur für POX2027 und POX4020 festgestellt. In der Literatur wurde bisher nur über einen konsistenz erhöhenden Einfluss von Lidocain auf POX-Wasser-Gele berichtet [Sharma et al., 2008b]. Als lipophiler Stoff befindet sich Lidocain vermutlich im lipophilen Mizellkern in der Nähe der PP-Gruppen des POX-Moleküls und beeinträchtigt deren Hydratation. Die Folge könnte eine Erniedrigung der CMC und des TGP sein, so dass das System früher gelieren könnte, was sich in einer Konsistenzhöhung bemerkbar machen würde.

Für die letzte Gruppe an Systemen mit konstantem Verhältnis von IPA/DMIS zu Wasser (1:2) (Abbildung 4.31) konnte unter Berücksichtigung der Standardabweichungen nur bei drei Zubereitungen ein Unterschied festgestellt werden: Lidocain hatte in diesen Fällen (POX3010, POX2720 und POX2330) einen konsistenzmindernden Effekt. Wie in Kapitel 4.1.4.3 beschrieben, stellt die Mizellbildung den ersten Schritt des Gelierungsprozesses dar. Wenn die Mischung aus Lidocain, IPA, DMIS und MIG in der Lage wäre die Löslichkeit der PP-Ketten zu verbessern, dann würde die CMC bei höherer Konzentration und somit die Gelierung des Systems bei höherer Temperatur auftreten, was sich in einer vergleichsweise niedrigen Konsistenz bei Umgebungstemperatur bemerkbar machen würde.

#### **4.2.1.2 Bestimmung des Thermogelierungspunktes (TGP)**

Wie bereits für die arzneistofffreien halbfesten Zubereitungen in Kapitel 4.1.4.3 beschrieben wurde, war die Bestimmung des TGP nicht für alle Systeme möglich, da ab POX/MIG-Konzentrationen über 30 % der TGP außerhalb des Meßbereiches lag. In Gegenwart von Lidocain und ALA traf das Gleiche zu. Abbildung 4.32 zeigt die bestimmbaren TGP für die wirkstofffreien und wirkstoffhaltigen Grundlagen. Das Ziel, den Einfluss der einzelnen Wirkstoffe bzw. Hilfsstoffe auf die Zubereitungen zu untersuchen, konnte in diesem Teil der Arbeit nur bedingt durchgeführt werden, da es nur bei den Systemen mit konstantem Mischungsverhältnis von POX/MIG zu Wasser ausreichend viele Zubereitungen mit einem bestimmbaren TGP gab. Die zwei anderen Gruppen beinhalteten außer POX2525, welches allen Gruppen angehörte, nur jeweils ein weiteres System mit bestimmtem TGP, so dass eine Aussage über den Einfluss der Hilfsstoffe in diesen Fällen schwer zu treffen war.



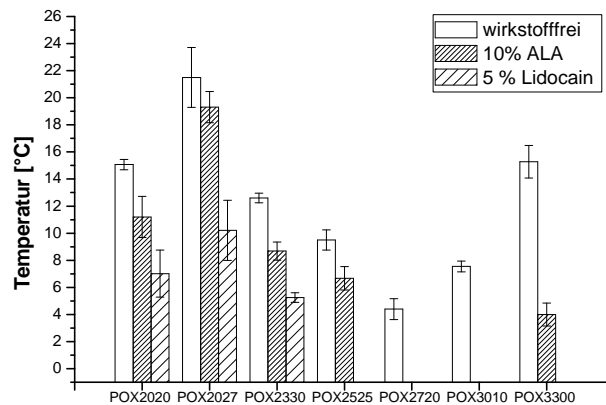


Abbildung 4.32: Bestimmung des TGP für die wirkstofffreien, ALA- und lidocainhaltigen Systeme.

Die Systeme mit konstantem Verhältnis von POX/MIG zu IPA/DMIS (1:1) zeigten eine Erniedrigung des TGP von ca. 15 °C für POX2020 auf 9,5 °C für POX2525. Ähnliches gilt für die Systeme mit konstantem Verhältnis von IPA/DMIS zu Wasser (1:2), bei denen eine Erniedrigung des TGP von 21,5 °C für POX2027 auf 9,5 °C für POX2525 stattfand. Für beide Gruppen lässt sich die Erniedrigung des TGP mit der Konzentrationszunahme an POX erklären. Die POX-Mizellen in POX2525, welches in beiden Fällen das System mit höherer POX-Konzentration darstellt, konnten hierdurch viel stärker miteinander interagieren, so dass es zur Ausbildung eines engmaschigeren Netzwerks kam, wodurch die Gelierung bei niedrigeren Temperaturen einsetzte [Wanka et al., 1990].

Für die letzte Gruppe war folgender Einfluss von IPA/DMIS auf den TGP erkennbar: eine Erhöhung von 0 auf 20 % IPA/DMIS führte zu einer Erniedrigung des TGP von ca. 15 auf ca. 4 °C. Eine weitere Erhöhung auf bis zu 30 % führte zu einer Erhöhung des TGP auf 12,6 °C. Dieses Ergebnis stimmte mit denen von 4.1.4.3 überein und unterstützte die dort aufgestellte Hypothese, dass die Mischung der drei Hilfsstoffe (IPA, DMIS und MIG) einen auf den TGP erniedrigenden Effekt haben könnte, solange die Konzentration an MIG nicht zu niedrig im Vergleich zu der der anderen beiden Hilfsstoffe ist. Es könnte sein, dass MIG durch eine Hydrophobisierung des Mizellinneren die Mizellbildung und somit die Gelierung förderte, wie für mittelkettige aliphatische Alkohole berichtet wurde [Caragheorgheopol et al., 1997] und dass dieser Effekt einen stärkeren Einfluss auf die TGP-Erniedrigung hatte als IPA, welches die Mizellbildung reduziert und den TGP erhöht [Pandit und McIntyre, 1997].

Durch eine weitere Erhöhung des IPA/DMIS- Gehaltes überwog der Effekt von IPA/DMIS, so dass der TGP anstieg.

Die Inkorporierung von ALA führte zu einer Erniedrigung des TGP, so dass nur für fünf von sieben Zubereitungen ein TGP bestimmt werden konnte. Die TGP-Erniedrigung beobachtete Grüning (2007) bereits für das System POX2525 und begründete sie mit einem Aussalzeffekt: Salze können im wässrigen Medium eine Hydrathülle ausbilden, so dass dem Polymer Wasser entzogen wird und die Polymerketten stärker miteinander interagieren können, wodurch es schneller zur Gelierung kommt.

Der gleiche TGP-erniedrigende Effekt (trotz niedriger Wirkstoffkonzentration) konnte für Lidocain in noch größerem Umfang beobachtet werden. In diesen Fällen konnte ein TGP nur noch für drei Zubereitungen ermittelt werden (POX2020, POX2027 und POX2330). Lidocain war als hydrophober Wirkstoff wahrscheinlich zu großen Teilen im Mizellinneren enthalten [Wanka et al., 1994; Sharma et al., 2008b], wo es zu einer Beeinträchtigung der Hydratation der PP-Einheiten kam. Dieses führte dazu, dass die CMC bei niedrigerer Konzentration und der TGP bei niedrigerer Temperatur erreicht wurden, was als Voraussetzung für die Gelierung anzusehen ist [Wanka et al., 1994]. Außerdem ist infolge der Inkorporierung von Lidocain eine Vergrößerung des Mizellenradius möglich [Sharma et al., 2008a], was eine Vergrößerung des mizellaren Volumenanteils verursachen würde und ebenfalls die Gelierung fördern könnte [Sharma und Bhatia, 2004].

#### **4.2.2 Permeationsuntersuchungen**

Die Permeationsuntersuchungen stellten vor dem Hintergrund einer optimierten ALA-Permeation durch isoliertes humanes Stratum corneum eines der Hauptziele dieser Arbeit dar. Zur besseren Vergleichbarkeit werden die Permeationsfluxe dargestellt. Diese lassen sich wie in 2.4.6 beschrieben aus der Steigung des linearen Teils der Permeationskurven berechnen und geben die Menge an Wirkstoff an, die pro Zeit und Fläche durch das SC diffundiert.

#### 4.2.2.1 Permeationsuntersuchungen mit ALA

Die Permeationsfluxe der ALA-haltigen Zubereitungen sind in den Abbildungen 4.33, 4.34 und 4.35 dargestellt. Für diese Untersuchungen wurde eine Hautspende aus der abdominalen Region einer 71-jährigen Patientin verwendet. In Abbildung 4.33 erkennt man, dass aufgrund der relativ hohen Standardabweichungen für alle Formulierungen mit konstantem Verhältnis von POX/MIG zu IPA/DMIS (1:1) keine signifikanten Unterschiede vorhanden waren. Man könnte höchstens von einer tendentiellen Erhöhung des Permeationsfluxes bei Erniedrigung des Wassergehaltes ausgehen. Diese Tendenz war allerdings nur für die vier ersten Systeme zu beobachten. Bei weiterer Erniedrigung des Wassergehaltes von 30 % auf 20 % (POX3535 und POX4040) kam es zu einem Abfall des Permeationsfluxes. Da alle Fluxwerte in der gleichen Größenordnung wie der Fluxwert des in der Vorgängerarbeit entwickelten Thermogels waren, scheint jedoch der Wassergehalt keine entscheidende Rolle für die Permeation von ALA zu spielen, obwohl die Rolle von Wasser als permeationsfördernde Substanz bekannt ist. Wasser kann die Bilayer-Region der Hautlipide fluidisieren, indem Wasserstoffbrücken mit den polaren funktionellen Gruppen der Lipide ausgebildet werden, so dass eine hydrophile Hülle entsteht, die die Interaktionen zwischen den Lipiden verringert. Auf diese Weise wird der Durchtritt für Arzneistoffe erleichtert [Barry, 1987]. Man könnte also vermuten, dass bereits eine kleine Menge Wasser (ca. 20 %, wie bei POX4040) ausreichend für eine permeationsfördernde Wirkung ist und eine weitere Erhöhung des Wassergehaltes keinen maßgeblichen Effekt ausübt. Außerdem ist anzumerken, dass in Anbetracht des Einsatzes von isoliertem Stratum corneum verschiedener Spender der Flux für POX2525 mit  $8,43 \times 10^{-9} \text{ g/cm}^2\text{s}$  gut mit den von Grüning (2007) für diese Zubereitung ermittelten Werten übereinstimmt ( $8,71 \times 10^{-9} \text{ g/cm}^2\text{s}$  bzw.  $1,21 \times 10^{-8} \text{ g/cm}^2\text{s}$ ). Die Permeationsfluxe der Formulierungen mit konstantem Verhältnis von IPA/DMIS zu Wasser (1:2) werden in Abbildung 4.34 gezeigt. Für die Permeationsuntersuchungen wurde POX5017 nicht berücksichtigt, weil durch den ALA-Zusatz die Konsistenz der Zubereitung für eine Applikation im Donor der modifizierten Franz-Zelle zu hoch war. Die berücksichtigten Formulierungen dieser Reihe lassen erkennen, dass bei den drei ersten Zubereitungen eine Erhöhung des POX/MIG-Gehaltes von 20 % auf 30 % zu einer Steigerung des Permeationsfluxes

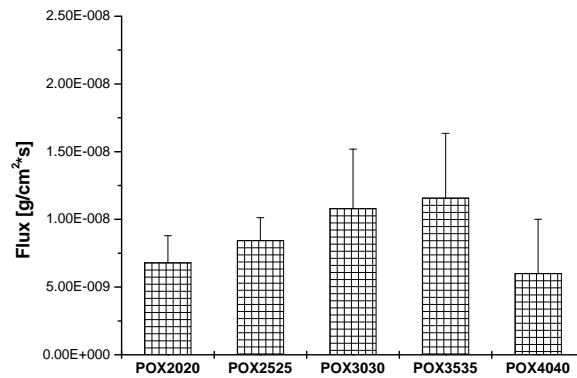


Abbildung 4.33: Permeationsfluxe der ALA-haltigen Grundlagen für die Systeme mit konstantem Verhältnis von POX/MIG zu IPA/DMIS (1:1). Der Wassergehalt nimmt von links nach rechts von 60, über 50, 40, 30 bis 20 % ab.

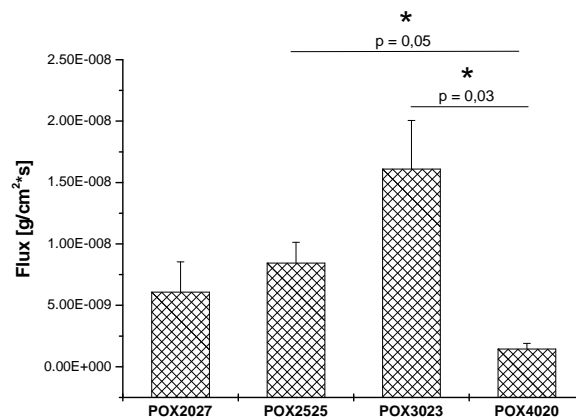


Abbildung 4.34: Permeationsfluxe der ALA-haltigen Grundlagen für die Systeme mit konstantem Verhältnis von IPA/DMIS zu Wasser (1:2). Der Wassergehalt nimmt von links nach rechts von 53, über 50, 47 bis 40 % ab.

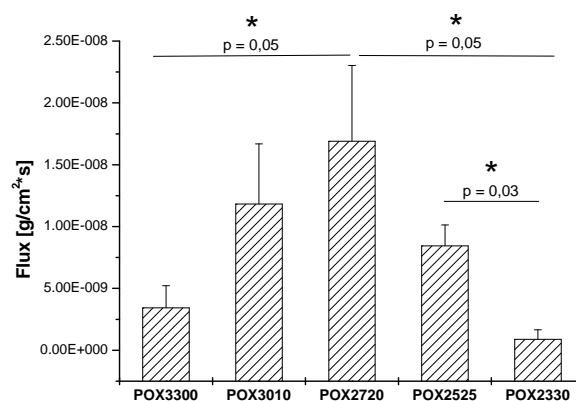


Abbildung 4.35: Permeationsfluxe der ALA-haltigen Grundlagen für die Systeme mit konstantem Verhältnis von POX/MIG zu Wasser (1:2). Der Wassergehalt nimmt von links nach rechts von 67, über 60, 53, 50 bis 47 % ab.

führte. Eine weitere Erhöhung auf 40 % (POX4020) führte jedoch zu einem signifikanten Abfall des Fluxes. Die Kombination aus POX und MIG scheint also eine große Bedeutung für die Permeationsverbesserung zu haben: im Vergleich mit dem ursprünglichen Thermogel (POX2525) konnte bei POX3023 ein um Faktor 1,91 höherer Flux erreicht werden (Tabelle 4.8). Ein penetrationsfördernder Effekt von POX dürfte mit dessen Tensidcharakter zusammenhängen. Sowohl ionische als auch nicht ionische Tenside zeigen permeationsfördernde Eigenschaften für viele Arzneistoffe [Ashton et al., 1992], indem Lipide durch Solubilisierung aus der Haut herausgelöst werden [Babita et al., 2006]. Ribaud et al (1994) postulierten hingegen, dass Tenside in einer Konzentration oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration stärker mit Hautlipiden interagieren, diese aber nicht extrahieren. Die Interaktion führt zur Zerstörung der Ordnung der Struktur der Hautlipide und somit zu einer Permeationsverbesserung. MIG spielte hierbei eine untergeordnete Rolle wegen des kleineren Mengenanteils in Vergleich zu POX. Trotzdem kann sein Einfluss nicht vernachlässigt werden, denn MIG ist in der Lage mit den lipophilen Bestandteilen des SC zu interagieren [Leopold und Lippold, 1995b]. Unpolare Stoffe können sich in den lipophilen Bereichen der Bilayer einlagern und somit die enge Packung der Lipide aufweiten, wodurch Arzneistoffe besser durch den Interzellularraum migrieren können [Barry, 1987]. Dass eine weitere Erhöhung der POX/MIG-Konzentration zu einem starken Abfall des Permeationsfluxes führt, hat vermutlich mit der damit verbundenen zu hohen komplexen Viskosität der Zubereitung zu tun.

Für die Permeationsfluxe der Systeme mit konstantem Verhältnis von POX/MIG zu Wasser (1:2) (Abbildung 4.35) führte eine Erhöhung der IPA/DMIS-Konzentration bis auf 20 % (POX2720) zu signifikant höheren Permeationsfluxen. Bei weiterer Erhöhung der IPA/DMIS-Konzentration auf 30 % fielen jedoch die Fluxe. IPA hat laut Literatur eine permeationsfördernde Wirkung, die auf einem Herauslösen von Hautlipiden beruht [Sinha und Kaur, 2000; Brinkmann und Müller-Goymann, 2003]. Eine Erhöhung der IPA-Konzentration sollte somit den Durchtritt von ALA vereinfachen [Chien et al., 1988]. Es schien jedoch eine Art lokales Maximum zu geben, das sich aufgrund der speziellen Zusammensetzung des Systems ergab.

Die permeationsfördernde Wirkung von DMIS ist zwar in der Literatur nicht beschrieben, aber aufgrund seiner solubilisierenden Eigenschaften denkbar. Es könnte wie Ethanol und Propylenglykol die Löslichkeit des Wirkstoffes nicht nur in der

Formulierung sondern auch in der Haut erhöhen [Yazdanian und Chen, 1995], indem es selbst durch die Haut permeiert und gleichzeitig gelöste Substanzen durch die Haut transportiert sowie deren Löslichkeit in lipophilen Strukturen der Haut verbessert. Möglich wäre auch eine Interaktion mit Keratin oder mit den polaren Gruppen der Hautlipide (s. 2.4.5).

Die hier vorgestellten Untersuchungen wurden unter den gleichen Bedingungen wie die von Grüning (2007) durchgeführt. Da aber mit Haut unterschiedlicher Spender gearbeitet wurde, sind die ermittelten Fluxe nicht direkt miteinander vergleichbar. Aus diesem Grund wurde das von Grüning entwickelte Thermogel (POX2525) als Referenz genommen, um mit Hilfe der Berechnung eines Faktors die Fluxe der hier untersuchten Zubereitungen mit denen der Basiscreme DAC und der Wasserhaltigen Hydrophilen Salbe (WHS) (aus der Vorgängerarbeit) zu vergleichen (Tabelle 4.8). POX2330 zeigte den niedrigsten Flux aller POX-haltigen Zubereitungen. Vergleicht man diesen Wert ( $0,88 \times 10^{-9} \text{ g/cm}^2\text{s}$ ) mit dem um interindividuelle Hautpermeabilitätsunterschiede korrigierten Flux der Basiscreme ( $0,84 \times 10^{-9} \text{ g/cm}^2\text{s}$ ) bzw. der WHS ( $0,36 \times 10^{-9} \text{ g/cm}^2\text{s}$ ) [Grüning und Müller-Goymann, 2008], so erkennt man dass der Flux aus POX2330 sich auf dem gleichen Niveau wie der aus Basiscreme befand und um Faktor 2,44 größer als der aus WHS war. Das bedeutet, dass alle weiteren in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zubereitungen eine Verbesserung der ALA-Permeation gegenüber den Arzneibuchgrundlagen zeigten. Dabei waren POX3023 und POX2720 die Zubereitungen mit den höchsten Flux-Daten ( $16,09$  bzw.  $16,91 \times 10^{-9} \text{ g/cm}^2\text{s}$ ) und somit POX2525 ( $8,43 \times 10^{-9} \text{ g/cm}^2\text{s}$ ) um ca. Faktor 2 überlegen. Im Vergleich zu den Arzneibuchgrundlagen waren die Fluxwerte dieser POX-haltigen Zubereitungen um Faktor 20 gegenüber dem Flux aus Basiscreme bzw. um Faktor 45 gegenüber dem aus WHS überlegen. Wie schon von Grüning (2007) postuliert wurde, schien die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Systeme essentiell für eine Verbesserung der ALA-Permeation zu sein. Der synergistische Effekt der Bestandteile in den POX-haltigen Systemen konnte durch Modifizierung der Rezeptur weiter optimiert werden. Es schien also einen Bereich innerhalb des pseudoternären Mischungs-dreiecks zu geben, in dem die Zusammensetzung der Systeme optimal für eine Verbesserung der ALA-Permeation war (Abbildung 4.39 A). Dieser erstreckte sich von 25 bis 35 % POX/MIG, von 10 bis 35 % IPA/DMIS und von 30 bis 60 % Wasser.

Tabelle 4.8: Permeationsfluxe für 5-ALA aus verschiedenen Formulierungen und Vergleich mit POX2525 bzw. Basiscreme DAC und Wasserhaltiger Hydrophiler Salbe (WHS) [Grüning und Müller-Goymann, 2008]. Hautspende 1: weiblich, abdominale Region, 71 Jahre alt; Hautspende 2: weiblich, abdominale Region, 48 Jahre alt.

Zubereitung	Flux J [g/cm <sup>2</sup> s x 10 <sup>-9</sup> ]	SD [g/cm <sup>2</sup> s x 10 <sup>-9</sup> ]	Faktor im Vergleich zu POX2525	errechnete Fluxe*	Faktor im Vergleich zu Basiscreme*	Faktor im Vergleich zu WHS*	Hautspende
POX2020	6,80	2,01	0,81		8,10	18,89	1
POX3030	10,80	4,38	<b>1,28</b>		<b>12,86</b>	<b>30,00</b>	
POX3535	11,58	4,77	<b>1,37</b>		<b>13,79</b>	<b>32,17</b>	
POX4040	6,03	4,01	0,72		7,18	16,75	
POX2027	6,07	2,46	0,72		7,23	16,86	
POX3023	16,09	3,97	<b>1,91</b>		<b>19,15</b>	<b>44,69</b>	
POX4020	1,48	0,46	0,18		1,76	4,11	
POX3300	3,43	1,79	0,41		4,08	9,53	
POX3010	11,82	4,87	<b>1,40</b>		<b>14,07</b>	<b>32,83</b>	
POX2720	16,91	6,13	<b>2,01</b>		<b>20,13</b>	<b>46,97</b>	
POX2330	0,88	0,77	0,10		1,05	2,44	
POX2525	8,43	1,70	1,00		10,04	23,42	
Thermogel	12,10	2,39	1,44	8,43			2
Basiscreme	1,20	0,67	0,14	0,84			
WHS	0,51	0,07	0,06	0,36			

\* korrigierte Fluxdaten in Bezug auf interindividuelle Stratum corneum-Permeabilitätsunterschiede.

#### 4.2.2.2 Permeationsuntersuchungen mit Lidocain

Um herauszufinden, ob der oben ermittelte Bereich im pseudoternären Mischungsdiagramm auch für andere Wirkstoffe gilt, wurden Permeationsuntersuchungen mit Lidocain als lipophiler Modellsubstanz durchgeführt. Hierfür wurde mit einer Hautspende aus der abdominalen Region einer 64-jährigen Patientin gearbeitet. Die Permeationsfluxe aus den lidocainhaltigen Systemen mit konstantem Verhältnis von POX/MIG zu IPA/DMIS (1:1) (Abbildung 4.36) unterschieden sich teilweise signifikant voneinander. Bei Erniedrigung des Wassergehaltes war die Permeation von Lidocain durch das SC erschwert. Trotz der höheren Lipophilie von Lidocain im Vergleich zu ALA schien Wasser einen höheren

Einfluss auf die Lidocain-Permeation zu haben. Es ist bekannt, dass Wasser den Hydratationszustand der polaren Gruppen der Hautlipide erhöht und gleichzeitig die Ordnung im lipophilen Bereich stört [Barry, 1987; Barry, 1991]. Dies könnte den verbesserten Durchtritt apolarer Substanzen wie Lidocain durch eine Erhöhung der Wassermenge im Vehikel erklären. Ein Grund für die erschwerte SC-Permeation bei geringen Wassergehalten der Formulierung könnte eine langsame Freisetzung von Lidocain aus der Grundlage sein. Die Affinität von Lidocain zu Systemen mit wenig Wasser könnte größer sein, womit sich eine schlechtere Freisetzung ergeben würde, die die Permeation dieses Wirkstoffes negativ beeinflussen könnte.

Bei den Permeationsfluxen der Systeme mit konstantem Verhältnis von IPA/DMIS zu Wasser (1:2) (Abbildung 4.37) konnte ebenfalls eine eindeutige Tendenz mit voneinander signifikant verschiedenen Permeationsfluxen beobachtet werden: mit steigendem POX/MIG-Gehalt kam es zu einer Erniedrigung des Permeationsfluxes. Für dieses Phänomen könnten mehrere Faktoren verantwortlich sein. Zum einen erhöhte sich mit steigendem POX/MIG-Gehalt der lipophile Anteil (MIG), wodurch vermutlich die Affinität des ebenfalls lipophilen Lidocains zur Grundlage größer wurde, so dass die Freisetzung aus diesem System sich verringerte und somit auch die Permeation. In Übereinstimmung mit einem Erklärungsmodell von Ricci et al. (2002) könnte eine Zunahme der POX-Konzentration zur Ausbildung eines stark vernetzten Gerüsts führen, so dass die Diffusion von Lidocain aus POX-Gelen erschwert und die Permeation negativ beeinflusst werden würde.

Für die Permeationsfluxe der dritten Gruppe (Systeme mit konstantem Verhältnis von POX/MIG zu Wasser (1:2)) konnte keine eindeutige Tendenz in Abhängigkeit vom IPA/DMIS-Gehalt beobachtet werden (Abbildung 4.38). Vielmehr befanden sich die Fluxwerte von drei der Zubereitungen ohne IPA/DMIS, bzw. mit 10 % und 30 % IPA/DMIS (POX3300, POX3010 und POX2330) auf einem ähnlichen mittleren Niveau, während die zwei anderen mit 20 % und 25 % IPA/DMIS das Minimum (POX2720) und das Maximum (POX2525) der Gruppe darstellten. Signifikante Unterschiede wurden auf der Ebene des mittleren Niveaus der Permeationsfluxe nicht festgestellt. Die Erhöhung des IPA/DMIS-Gehaltes konnte daher nicht mit einer Verbesserung oder Verschlechterung des Permeationsfluxes korreliert werden. Man könnte lediglich postulieren, dass eine optimierte Zusammensetzung eine verbesserte Permeation von Lidocain ermöglicht. Für Lidocain ergab sich ebenfalls



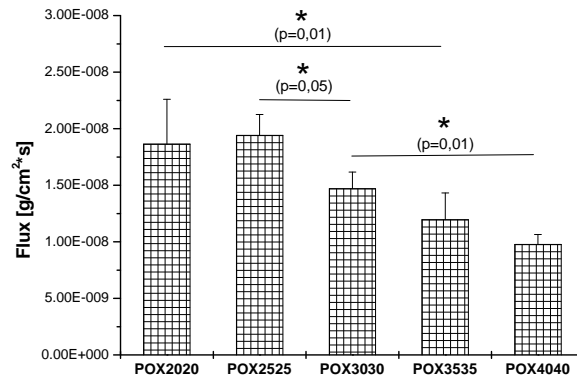


Abbildung 4.36: Permeationsfluxe der Lidocain-haltigen Systeme mit konstantem Verhältnis von POX/MIG zu IPA/DMIS (1:1). Der Wassergehalt nimmt von links nach rechts von 60, über 50, 40, 30 bis 20 % ab.

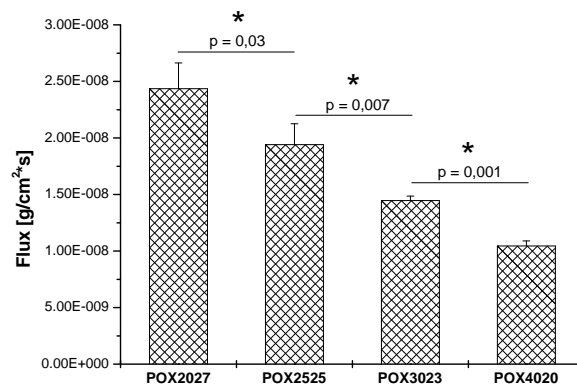


Abbildung 4.37: Permeationsfluxe der Lidocain-haltigen Systeme mit konstantem Verhältnis von IPA/DMIS zu Wasser (1:2). Der Wassergehalt nimmt von links nach rechts von 53, über 50, 47 bis 40 % ab.

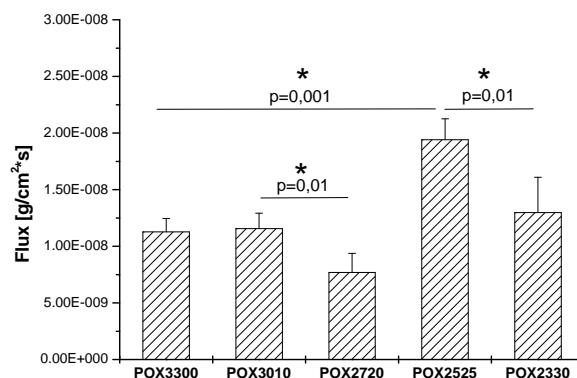


Abbildung 4.38: Permeationsfluxe der Lidocain-haltigen Systeme mit konstantem Verhältnis von POX/MIG zu Wasser (1:2). Der Wassergehalt nimmt von links nach rechts von 67, über 60, 53, 50 bis 47 % ab

ein Bereich innerhalb des pseudoternären Mischungsdiagramms mit günstigen Eigenschaften für dessen Permeation. Dieser Bereich erstreckte sich jeweils von 20 bis 30 % POX/MIG und IPA/DMIS sowie von 40 bis 60 % Wasser (Abbildung 4.39).

#### 4.2.2.3 Vergleich der Permeationsfluxe von ALA und Lidocain

Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften von ALA und Lidocain waren unterschiedliche Permeationsverhalten zu erwarten. Auch wenn beide Wirkstoffe ein relativ kleines Molekulargewicht haben, ist ALA sehr hydrophil und somit weniger gut für den Transport durch die Haut geeignet, während Lidocain eher lipophil und somit besser für die dermale Applikation geeignet ist. Daher waren die Permeationsfluxe für Lidocain höher als für ALA, denn eine größere Menge Wirkstoff konnte pro Fläche und Zeit durch das SC diffundieren.

Betrachtet man für beide Wirkstoffe die Einflussnahme eines variierten Parameters in den drei verschiedenen Messreihen, so erkennt man teilweise einen entgegengesetzten Effekt auf die Permeationsfluxe. Bei den Zubereitungen mit konstantem Verhältnis von POX/MIG zu IPA/DMIS (1:1) wurde für ALA mit Erniedrigung der Wasserkonzentration von 60 % auf 30 % eine zwar nicht signifikante aber tendenzielle Erhöhung der Permeationsfluxe beobachtet, während sich für Lidocain kleiner werdende Permeationsfluxe ergaben, wenn der Wassergehalt von 50 % auf 20 % fiel. Ein entgegengesetzter Trend war ebenfalls für die Systeme mit konstantem Verhältnis von IPA/DMIS zu Wasser (1:2) zu beobachten. Die Permeationsfluxe aus ALA-haltigen Zubereitungen stiegen mit zunehmendem POX/MIG-Gehalt von 20 % auf 30 %, während die Permeationsfluxe der lidocainhaltigen Zubereitungen bei POX/MIG-Gehalten von 20 % bis 40 % signifikant sanken. Bei den Systemen mit konstantem Verhältnis von POX/MIG zu Wasser (1:2) war zwar kein einheitlicher Trend bei Variation des IPA/DMIS-Gehaltes zu beobachten, doch die Zubereitung, die mit ALA den höchsten Permeationsflux zeigte, zeigte mit Lidocain den niedrigsten Flux.

Innerhalb definierter Grenzen konnten für beide Wirkstoffe Tendenzen beobachtet und lokale Maxima identifiziert werden. Diese stimmten aber, wie in Abbildung 4.39 und Tabelle 4.9 zu erkennen ist, nicht miteinander überein: je nach Wirkstoff eigneten sich unterschiedliche Systeme am besten für eine Permeation. Für ALA war in Bezug auf höchste Fluxwerte POX2720 die geeignetste Zubereitung dicht gefolgt von

POX3023. Hierbei handelte es sich um Zubereitungen mit mittleren Konzentrationen an POX/MIG (27-30 %), 20 bis 23 % IPA/DMIS und viel Wasser (47 bzw. 53 %). Die restlichen Zubereitungen, die noch einen akzeptablen Permeationsflux zeigten, erstreckten sich über einen breiten Bereich mit Konzentrationen von POX/MIG zwischen 25 und 35 %, einem IPA/DMIS-Gehalt zwischen 10 und 35 % und einem Wasseranteil zwischen 20 und 60 %.

Für Lidocain war hingegen POX2027 mit Abstand die Zubereitung mit dem höchsten Permeationsflux gefolgt von POX2525 und POX2020. Diese drei Zubereitungen hatten einen niedrigeren POX/MIG-Gehalt (20 bis 25 %), sowie einen vergleichbaren bzw. höheren IPA/DMIS-Gehalt als die am besten für die ALA-Permeation geeigneten Zubereitungen (20 bis 27 %) und einen vergleichbar großen Wassergehalt (50 bis 60 %). Trotz der dargestellten Unterschiede lässt sich im pseudoternären Mischungs-dreieck für beide Wirkstoffe ein nahezu identischer Bereich in Bezug auf höchstmögliche Permeation identifizieren. Bereits kleine Veränderungen in der Zusammensetzung haben jedoch einen positiven oder negativen Effekt auf die Permeationsfluxe.

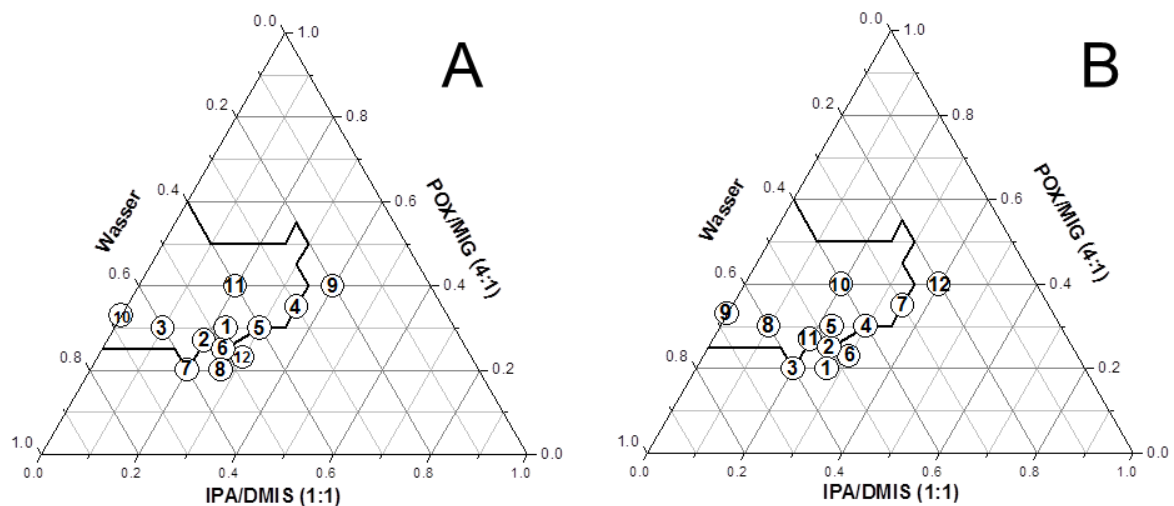


Abbildung 4.39: Rangfolge der Permeationsfluxe für A: ALA und B: Lidocain.

Tabelle 4.9: Rangfolge der Permeationsfluxe für ALA und Lidocain

ALA			Lidocain		
Rang	Zubereitung	Flux x 10 <sup>-8</sup>	Rang	Zubereitung	Flux x 10 <sup>-8</sup>
1	POX2720	1,69	1	POX2027	2,44
2	POX3023	1,61	2	POX2525	1,94
3	POX3010	1,18	3	POX2020	1,86
4	POX3535	1,16	4	POX3030	1,47
5	POX3030	1,08	5	POX3023	1,45
6	POX2525	0,84	6	POX2330	1,30
7	POX2020	0,68	7	POX3535	1,20
8	POX2027	0,61	8	POX3010	1,16
9	POX4040	0,60	9	POX3300	1,13
10	POX3300	0,34	10	POX4020	1,04
11	POX4020	0,15	11	POX4040	0,98
12	POX2330	0,09	12	POX2720	0,77

### 4.2.3 DSC-Untersuchungen

Mittels DSC-Untersuchungen sollten Interaktionen zwischen den Zubereitungen und den Hautbestandteilen nachgewiesen werden. DSC-Untersuchungen wurden mit einer Hautspende aus der abdominalen Region einer 51-jährigen Patientin durchgeführt. Um den Einfluss jedes einzelnen Hilfsstoffes zu untersuchen, wurden SC- Stücke jeweils mit den einzelnen Hilfsstoffen wie in Kapitel 3.2.11.2 beschrieben behandelt. Die DSC-Ergebnisse sind in Abbildung 4.40 und Tabelle 4.10

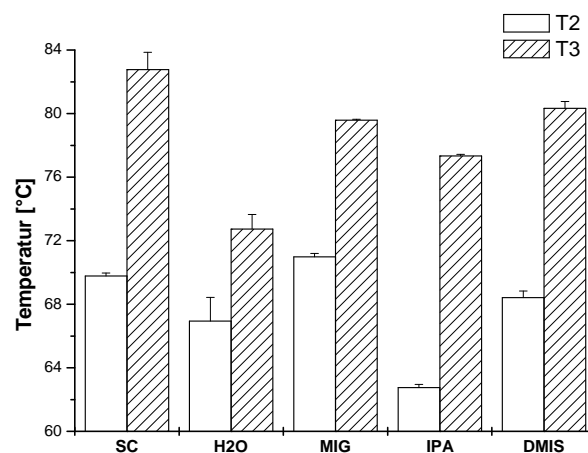


Abbildung 4.40: DSC-Temperaturübergänge T2 und T3 von unbehandeltem und mit dem jeweiligen Hilfsstoff behandeltem SC (n=3, Mittelwert + Standardabweichung).

dargestellt. Diese Ergebnisse entsprachen nur teilweise denen von Grüning (2007). Da die Untersuchungen von Grüning jedoch nur mit  $n=1$  durchgeführt wurden, wurden sie in der Diskussion der vorliegenden Arbeit nicht mitberücksichtigt. Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Hilfsstoffe einen unterschiedlich großen Einfluss auf die Hautlipide hatten. Gemäß Leopold und Lippold (1995) handelt es sich um eine signifikante Verschiebung eines Phasenüberganges, wenn diese mehr als  $3\text{ °C}$  beträgt. Demnach war IPA in der Lage beide Phasenübergänge (T2 und T3) signifikant zu verändern ( $> 3\text{ °C}$ ), wobei T2 am meisten beeinflusst wurde ( $-7,03\text{ °C}$ ). Wasser konnte nur T3 signifikant verändern ( $-10,03\text{ °C}$ ). MIG verschob im Gegensatz zu der in der Literatur beschriebenen nicht vorhandenen Wirkung [Leopold und Lippold, 1995b] T3 signifikant, während DMIS keine signifikanten Veränderungen ( $< 3\text{ °C}$ ) für beide Übergänge zeigte.

Tabelle 4.10: Phasenübergangstemperaturen von unbehandeltem SC verglichen mit den Phasenübergangstemperaturen des mit den reinen Hilfsstoffen behandelten SC ( $n=3$ , Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD)).

Stratum corneum behandelt mit	T2 [°C]	SD [°C]	Differenz zu unbehandeltem SC	T3 [°C]	SD [°C]	Differenz zu unbehandeltem SC
Unbehandelt	69,78	0,19	0	82,76	1,09	0
Wasser	66,95	1,49	-2,83	72,73	0,92	-10,03
Miglyol 840	70,98	0,22	+1,20	79,59	0,06	-3,17
Isopropanol	62,75	0,20	-7,03	77,33	0,13	-5,43
Dimethylisoborbid	68,42	0,42	-1,36	80,33	0,43	-2,43

#### 4.2.3.1 DSC-Untersuchungen mit wirkstofffreien Grundlagen

Nach Einlegen des SC in die wirkstofffreien Grundlagen und dessen Inkubation gemäß 3.2.11.2 wurden DSC-Untersuchungen durchgeführt, deren Ergebnisse in Abbildung 4.41 und Tabelle 4.11 dargestellt sind. Außer POX3300 (einziges System mit nur 3 Komponenten) waren alle anderen untersuchten Zubereitungen in der Lage beide Übergänge T2 und T3 um mehr als  $3\text{ °C}$  signifikant zu verändern. Winkler und Müller Goymann (2005) fanden Verschiebungen von  $2,4\text{ °C}$  (T2) und  $2,0\text{ °C}$  (T3)

Tabelle 4.11: Verschiebung der Phasenübergänge (n=3) von SC nach Behandlung mit verschiedenen wirkstofffreien und wirkstoffhaltigen (A: 10 % ALA, L: 5 % Lidocain) Zubereitungen. Fett gedruckt sind die stärksten Verschiebungen innerhalb einer Gruppe.

SC behandelt mit	T2 [°C]	SD [°C]	Differenz zu unbehandeltem SC	T3 [°C]	SD [°C]	Differenz zu unbehandeltem SC
POX2020	64,56	0,63	-5,22	73,18	0,46	-9,59
POX3030	62,73	0,20	-7,05	68,53	0,62	<b>-14,24</b>
POX3535	61,18	0,58	<b>-8,60</b>	72,93	1,17	-9,83
POX2027	60,63	0,88	<b>-9,15</b>	71,05	0,18	<b>-11,72</b>
POX3023	64,49	0,40	-5,29	72,20	0,21	-10,56
POX4020	64,32	0,49	-5,46	71,11	0,55	-11,65
POX3300	67,74	0,18	-2,04	77,11	0,58	-5,65
POX3010	65,55	0,88	-4,24	74,71	0,89	-8,05
POX2720	62,86	0,45	-6,92	72,40	0,08	-10,36
POX2330	62,70	0,37	<b>-7,09</b>	71,16	0,67	<b>-11,61</b>
POX2525	64,26	0,11	-5,53	72,92	1,27	-9,84
POX2020A	62,93	0,11	-6,86	70,84	0,23	-11,92
POX3030A	60,51	0,14	-9,27	68,71	0,21	<b>-14,06</b>
POX3535A	60,17	0,74	<b>-9,62</b>	68,98	0,74	-13,78
POX2027A	61,71	0,33	<b>-8,08</b>	69,16	1,44	<b>-13,60</b>
POX3023A	62,84	0,42	-6,95	71,50	0,30	-11,27
POX4020A	66,78	0,57	-3,00	71,75	0,44	-11,01
POX3300A	67,14	0,30	-2,64	76,17	0,32	-6,59
POX3010A	65,80	0,29	-3,99	74,88	0,17	-7,88
POX2720A	65,76	0,33	-4,02	71,16	0,26	-11,60
POX2330A	61,34	0,23	<b>-8,45</b>	69,15	0,21	<b>-13,61</b>
POX2525A	62,15	0,22	-7,64	70,37	0,18	-12,39
POX2020L	60,74	0,33	-9,05	72,58	0,57	-10,18
POX3030L	59,13	1,00	<b>-10,65</b>	68,35	0,94	<b>-14,42</b>
POX3535L	60,16	0,37	-9,63	69,86	1,03	-12,91
POX2027L	58,96	0,71	<b>-10,83</b>	68,92	0,06	<b>-13,85</b>
POX3023L	61,39	0,11	-8,40	69,01	0,64	-13,75
POX4020L	62,86	0,48	-6,92	69,57	0,07	-13,19
POX3300L	64,18	0,11	-5,61	72,88	0,75	-9,88
POX3010L	61,95	1,49	-7,84	71,65	0,49	-11,11
POX2720L	61,49	0,59	-8,30	70,02	0,65	-12,74
POX2330L	58,98	0,24	<b>-10,80</b>	67,73	0,60	<b>-15,04</b>
POX2525L	61,20	0,08	-8,59	69,82	0,49	-12,95

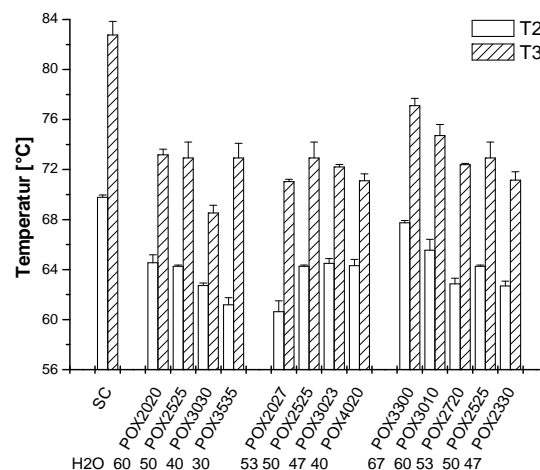


Abbildung 4.41: Temperaturübergänge T2 und T3 des unbehandelten und mit den wirkstofffreien Grundlagen behandelten SC ermittelt über DSC (n=3, Mittelwert + Standardabweichung). Gruppierung gemäß Tabelle 4.6.

zwischen nicht und komplett hydratisiertem SC. Da die Veränderungen für die wirkstofffreien Zubereitungen größer als 2 °C waren, wurde die gemessene Verschiebung der Phasenübergänge nicht nur dem Einfluss des Wassergehaltes der Zubereitungen zugeordnet, sondern auch auf die komplexe Zusammensetzung der Formulierungen zurückgeführt.

Betrachtet man die verschiedenen Gruppen der wirkstofffreien Systeme (Abbildung 4.41), so erkennt man vor allem für T2 in allen drei Reihen klare Tendenzen. Demnach veränderte sich T2 umso mehr

- je niedriger der Wassergehalt für die Systeme mit festem Mischungsverhältnis von POX/MIG (4:1) zu IPA/DMIS (1:1) von 1:1,
- je niedriger die POX/MIG-Konzentration für die Systeme mit festem Mischungsverhältnis von IPA/DMIS (1:1) zu Wasser von 1:2 und
- je höher der IPA/DMIS-Gehalt für die Systeme mit festem Mischungsverhältnis von POX/MIG (4:1) zu Wasser von 1:2

waren. Für T3 konnte für die erste Gruppe keine klare Tendenz beobachtet werden. Hier wurde die größte Verschiebung bei POX3030 (-14,24 °C) gefunden. Für die zwei nächsten Gruppen wurden ähnliche Verläufe wie bei T2 beobachtet, wobei POX2027 die Zubereitung mit der größten Veränderung (-11,72 °C) bei der zweiten Gruppe und POX2330 bei der dritten Gruppe (-11,61 °C) war. Das von Grüning

(2007) entwickelte Thermogel (POX2525) lag mit Verschiebungen von  $-5,53\text{ °C}$  für T2 und  $-9,84\text{ °C}$  für T3 im mittleren bis unteren Bereich, woraus man folgern kann, dass mit einer Veränderung der Rezeptur eine deutlich größere Verschiebung der Phasenübergänge realisierbar ist.

#### **4.2.3.2 DSC-Untersuchungen mit ALA-haltigen Zubereitungen**

Die Ergebnisse der DSC-Untersuchungen mit den ALA-haltigen Zubereitungen werden in Abbildung 4.42 und Tabelle 4.11 gezeigt. In diesem Fall ergab sich ein sehr ähnliches Bild wie bei den wirkstofffreien Zubereitungen: mit wenigen Ausnahmen zeigten die untersuchten Systeme signifikante Veränderungen für beide Übergänge T2 und T3. Im Vergleich mit den wirkstofffreien Formulierungen waren T2 und T3 um 1-3 K stärker zu niedrigeren Phasenübergangstemperaturen verschoben. Die Einarbeitung von ALA in die Grundlagen hatte demnach nur einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Verschiebung der Phasenübergänge ( $< 3\text{ °C}$ ). Außerdem zeigte ALA selbst keine Interaktionen mit den Hautbestandteilen in Form von veränderten T2 und T3 Phasenübergängen. Die größte Verschiebung der Phasenübergänge erreichte man für Systeme mit festem Mischungsverhältnis von POX/MIG (4:1) zu IPA/DMIS (1:1) von 1:1 bei niedrigem Wassergehalt. Bei Systemen mit festem Mischungsverhältnis von IPA/DMIS (1:1) zu Wasser von 1:2 wurden die Phasenübergänge am meisten verschoben, wenn die POX/MIG-Konzentration niedrig war, während bei Systemen mit festem Mischungsverhältnis von POX/MIG (4:1) zu Wasser von 1:2 die größte Verschiebung bei hoher IPA/DMIS-Konzentration erreicht wurde. Auch in diesem Fall war POX3300A, das einzige ternäre System, die Zubereitung mit den kleinsten Veränderungen ( $-2,64\text{ °C}$  für T2 und  $-6,59\text{ °C}$  für T3). Innerhalb der untersuchten Gruppen wurde T2 von POX3535A ( $-9,62\text{ °C}$ ), POX2027A ( $-8,08\text{ °C}$ ) und POX2330A ( $-8,45\text{ °C}$ ) am meisten verschoben, während T3 am meisten von POX3030A ( $-14,06\text{ °C}$ ), POX2027A ( $-13,60\text{ °C}$ ) und POX2330A ( $-13,61\text{ °C}$ ) verändert wurde.



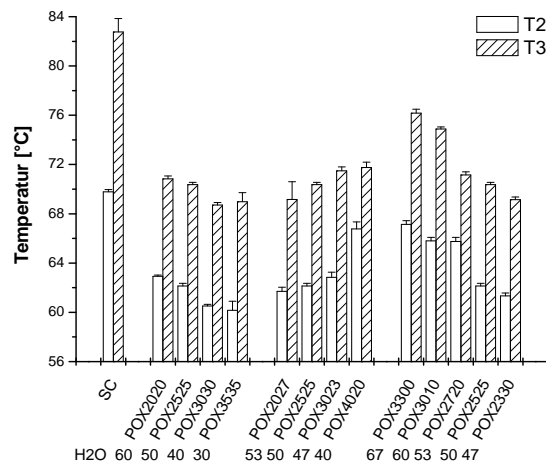


Abbildung 4.42: Temperaturübergänge T2 und T3 des unbehandelten und mit den ALA-haltigen Grundlagen behandelten SC ermittelt über DSC (n=3, Mittelwert + Standardabweichung). Gruppierung gemäß Tabelle 4.6.

#### 4.2.3.3 DSC-Untersuchungen mit lidocainhaltigen Zubereitungen

Bei den DSC-Untersuchungen des SC mit den lidocainhaltigen Zubereitungen wurden ebenfalls (außer bei T3 in der zweiten Gruppe) ähnliche Tendenzen wie bei den wirkstofffreien und den ALA-haltigen Zubereitungen beobachtet (Abbildung 4.43 und Tabelle 4.11). In der ersten Gruppe verschob POX3030L beide Übergänge am stärksten (-10,65 °C für T2 und -14,42 °C für T3). Die zweite Gruppe wies für T2 die gleiche Tendenz wie in 4.2.3.1 und 4.2.3.2 auf, während sich T3 für alle vier Zubereitungen ungefähr auf dem gleichen Niveau befand. Innerhalb dieser Gruppe zeigte POX2027L mit -10,83 °C für T2 und -13,85 °C für T3 die stärksten Verschiebungen. Die dritte Gruppe zeigte für beide Übergänge eine deutliche Tendenz: je größer der IPA/DMIS-Gehalt, umso größer waren die Verschiebungen der Übergänge. Somit war POX2330L die Zubereitung, die beide Phasenübergänge am meisten veränderte (-10,80 °C für T2 und -15,04 °C für T3). Auch für diese Zubereitungen bestätigte sich, dass POX3300L als 3-Komponentensystem die Zubereitung mit den kleinsten Veränderungen für beide Phasenübergänge war. Die Einarbeitung von Lidocain schien einen größeren Einfluss auf die Lage der Phasenübergänge zu haben als die Einarbeitung von ALA, denn mehr als die Hälfte der Zubereitungen zeigte Veränderungen größer als 3 °C verglichen mit den wirkstofffreien Grundlagen. Aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften könnte Lidocain in der Lage sein mit Hautlipiden zu interagieren und somit ihre Ordnung zu stören, so dass sich dies in den DSC-Untersuchungen bemerkbar machte.

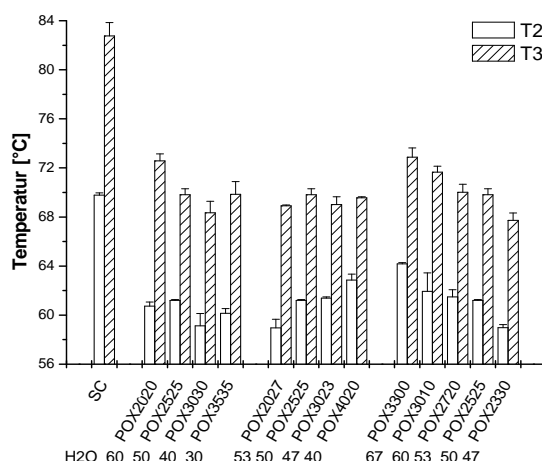


Abbildung 4.43: Temperaturübergänge T2 und T3 des unbehandelten und mit den lidocainhaltigen Grundlagen behandelten SC ermittelt über DSC (n=3, Mittelwert + Standardabweichung). Gruppierung gemäß Tabelle 4.6.

#### 4.2.4 Röntgenkleinwinkeluntersuchungen (SAXD)

Mittels Röntgenkleinwinkeluntersuchungen (SAXD) sollte die aufgrund der Ringing-Gel-Eigenschaften als kubisch flüssigkristallin vermutete Struktur bestätigt und weiteruntersucht werden. Hierfür wurden außer den Zubereitungen aus Tabelle 4.6 weitere Systeme untersucht, um die Daten zu vervollständigen (Tabelle 4.12).

Tabelle 4.12: Zusammensetzung der Systeme zur Ergänzung der SAXD-Untersuchungen.

Zubereitung	Besonderheit	POX [%]	MIG [%]	IPA [%]	DMIS [%]	Wasser [%]
POX2000	kein IPA/DMIS	16	4	0	0	80
POX4000		32	8	0	0	60
POX5000		40	10	0	0	50
POX2406	POX/MIG:IPA/DMIS (4 :1)	19,2	4,8	3,0	3,0	70
POX3208		25,6	6,4	4,0	4,0	60
POX4010		32,0	8,0	5,0	5,0	50
POX4812		38,4	9,6	6,0	6,0	40

##### 4.2.4.1 SAXD der wirkstofffreien Grundlagen

Mittels SAXD-Untersuchungen wurden bei den wirkstofffreien Grundlagen innerhalb des pseudoternären Mischungsdreiecks zwei flüssigkristalline Strukturen identifiziert (Abbildung 4.44). Zubereitungen mit wenig IPA/DMIS (< 10 %) und mittleren

POX/MIG-Konzentrationen (24 – 40 %) konnten einer kubisch flächenzentrierten flüssigkristallinen Struktur vom Typ Fm3m zugeordnet werden (Abbildung 4.45). Die Netzebenenabstände der fünf Formulierungen mit dieser Raumgruppe variierten zwischen 16,12 und 17,04 nm (Tabelle 4.13). Bei dem kubisch flächenzentrierten Kristallgitter sind acht Atome so angeordnet, dass sie die Ecken eines Würfels bilden. Zusätzlich sind insgesamt sechs weitere Atome mittig auf den Würfelflächen so angeordnet, dass durch deren Verbindung ein Oktaeder entsteht (Abbildung 4.46 B).

Tabelle 4.13: Netzebenenabstände der mittels SAXD untersuchten Zubereitungen.

Zubereitung	Struktuzuordnung	Netzebenenabstand d [nm]
POX2000	niedrige Intensität	19,07
POX2406	Fm3m	16,35
POX3010		16,12
POX3208		16,83
POX3300		17,04
POX4000		16,50
POX2020	niedrige Intensität	16,25
POX2330		14,50
POX2027	Pn3m	15,30
POX2525		15,32
POX2720		15,46
POX3023		14,80
POX3030		14,20
POX3535	Pn3m oder Im3m	13,41
POX4040		13,00
POX2020A	Fm3m	16,81
POX2525A	Pn3m	15,46
POX2525A 40°C		15,46
POX2330A		15,45

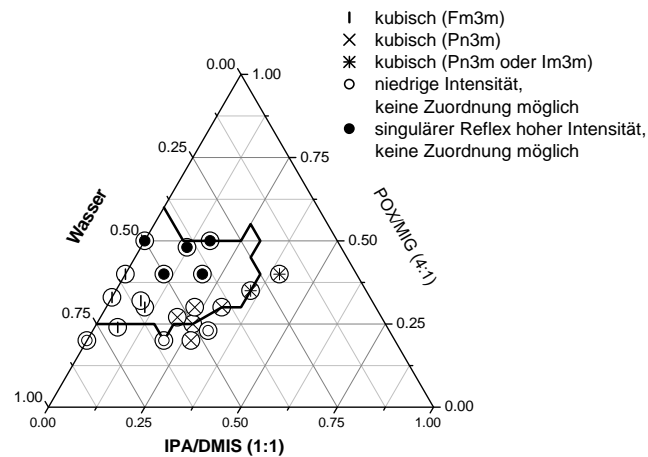


Abbildung 4.44: Pseudoternäres Mischungsdiagramm mit der Kennzeichnung der verschiedenen kubischen Flüssigkristalle.

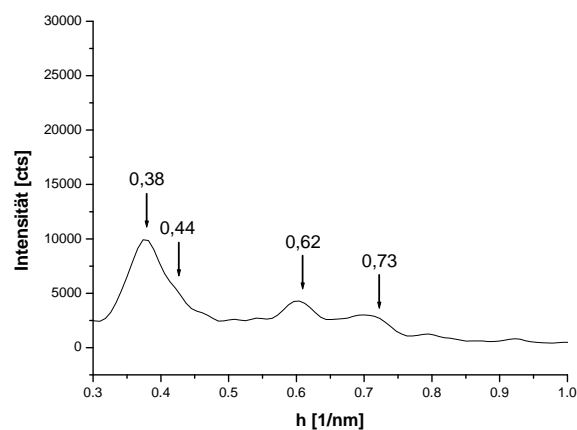


Abbildung 4.45: Reflexfolge einer kubischen Struktur vom Typ I mit der Raumgruppe Fm3m am Beispiel von POX3208.

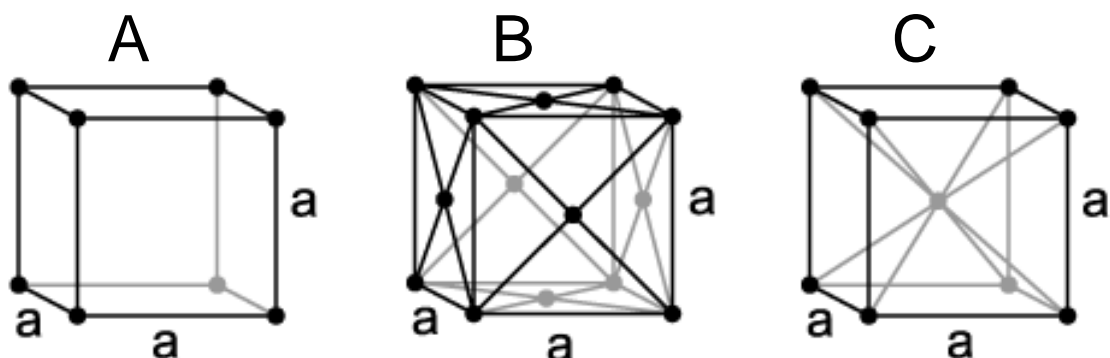


Abbildung 4.46: Verschiedene Möglichkeiten einer kubischen Anordnung. A: primitiv, B: flächenzentriert, C: raumzentriert.

Das bekannteste Beispiel einer kubisch flächenzentrierten Kristallstruktur ist Natriumchlorid, bei dem sich die kleineren Na-Ionen zwischen den Cl-Ionen befinden. Im Falle von flüssigkristallinen Strukturen auf POX-Basis stellt man sich Mizellen vor, die in den Ecken des Würfels bzw. in der Mitte der Würfelflächen lokalisiert sind [Ivanova et al., 2000a].

Eine kubisch flächenzentrierte Struktur wurde für POX bisher in der Literatur nicht beschrieben. Es wurden aber ausschließlich Zwei- oder Dreikomponentensysteme untersucht und nicht komplexere wie die hier untersuchten Zubereitungen. Mortensen (1996) behauptete, dass mizellare POX-Systeme zur Bildung raumzentrierter Strukturen tendieren, weil voluminöse Mizellen mit voll hydratisierten Polymerketten miteinander in Wechselwirkung treten und sich in einer dichtesten Kugelpackung anordnen (Raumzentrierung). Aufgrund dieser Interaktionen und des größeren Platzbedarfes von POX-Mizellen ist die Ausbildung einer flächenzentrierten Struktur unwahrscheinlicher. Wenn jedoch die Hydratation der Mizellen abnimmt, nehmen die Interaktionen zwischen den Mizellen ab, so dass sich flächenzentrierte Strukturen ausbilden können [Mortensen, 1996]. Es könnte sein, dass die komplexe Zusammensetzung der Systeme in diesem Bereich des pseudoternären Mischungsdreiecks die Ausbildung wenig voluminöser Mizellen ermöglichte, so dass die Aggregate als flächenzentrierte Struktur vorlagen.

Die zweite zugeordnete flüssigkristalline Struktur war eine kubisch primitive vom Typ Pn3m (Abbildung 4.47). Bei einer kubisch primitiven Struktur befindet sich jeweils an den Ecken der würfelförmigen Elementarzelle ein Atom bzw. bei POX-Systemen eine Mizelle (Abbildung 4.46 A). Beispiele für eine kubisch primitive Kristallstruktur sind unter anderem  $\alpha$ -Polonium, sowie die Hochdruckmodifikationen von Phosphor und Antimon. Diese Gruppe umfasste fünf Zubereitungen mit POX/MIG- und IPA/DMIS-Gehalten zwischen 20 und 30 %. Die Netzebenenabstände waren kleiner als die der ersten Gruppe mit Werten zwischen 14,20 und 15,46 nm (Tabelle 4.13). Kubisch primitive Strukturen wurden für POX-Systeme von mehreren Autoren beschrieben [Landh, 1994; Holmqvist et al., 1997; Ivanova et al., 2000b]. Diese behaupteten, dass kubisch primitive Strukturen Variationen in der Zusammensetzung tolerieren, allerdings nur bis zu einem bestimmten Punkt, ab dem sich andere Flüssigkristalle wie hexagonale und lamellare entwickeln.

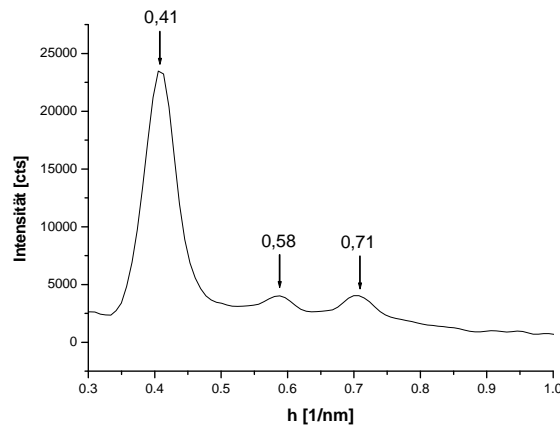


Abbildung 4.47: Reflexfolge einer kubischen Struktur vom Typ II mit der Raumgruppe Pn3m am Beispiel von POX2525.

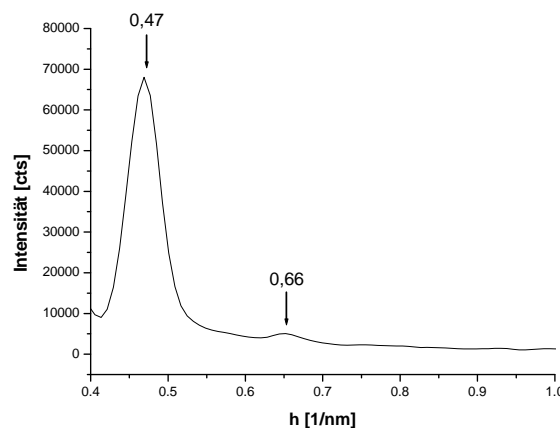


Abbildung 4.48: Reflexfolge einer kubischen Struktur vom Typ II oder IV mit der Raumgruppe Im3m am Beispiel von POX3535.

Bei zwei Zubereitungen (POX3535 und POX4040) wurden nur zwei Reflexe beobachtet, die keine eindeutige Zuordnung zuließen (Abbildung 4.48). Die Reflexfolge könnte entweder einer kubischen primitiven Pn3m oder einer kubischen raumzentrierten Im3m (Abbildung 4.46 C) Raumgruppe zugeordnet werden. Auffällig war, dass die Netzebenenabstände dieser beiden Zubereitungen mit 13,00 und 13,41 nm die niedrigsten aller untersuchten Zubereitungen waren (Abbildung 4.48). Dies sprach für die Entstehung einer neuen kubischen Struktur, bei der die Mizellen dichter gepackt sein müssten, wobei eine raumzentrierte Struktur möglich wäre, da diese für POX-Systeme bekannt ist [Mortensen und Talmon, 1995; Ivanova et al., 2000a]. Bei den untersuchten Systemen konnte nicht in allen Fällen eine Zuordnung

der Struktur vorgenommen werden: bei drei Zubereitungen (POX2000, POX2020 und POX2330) waren die Streuintensitäten sehr niedrig. Zwar waren mehrere Reflexe detektierbar, doch ließen sie sich keiner flüssigkristallinen Struktur zuordnen. Möglicherweise waren die als Reflexe angenommenen Maxima aufgrund von Schwankungen der Streuintensität entstanden. Bei diesen Systemen wäre wahrscheinlich eine längere Messdauer nötig gewesen. Bei höheren POX/MIG-Konzentrationen ( $\geq 40\%$ ) wurde nur ein Reflex beobachtet. Dieser wurde so breit, dass andere eventuell vorhandene Reflexe nicht erkannt werden konnten, so dass keine Strukturzuordnung möglich war. Außerdem war die Breite des Hauptreflexes so groß, dass die genaue Ermittlung der Position des Maximums und damit des Netzebenenabstandes ungenau gewesen wäre.

Betrachtet man die Netzebenenabstände der verschiedenen Systeme innerhalb der in diesem Kapitel gebildeten Gruppen, so ergeben sich deutliche Tendenzen. Im Folgenden wird der Einfluss der Hilfsstoffe auf den Netzebenenabstand hypothesengetrieben behandelt.

In der Gruppe mit konstantem Verhältnis von POX/MIG zu IPA/DMIS (1:1) führte eine Erhöhung des Wassergehaltes zu einem größeren Netzebenenabstand (Abbildung 4.49). Dieses Phänomen war zu erwarten, denn durch eine Verdünnung der Systeme mit Wasser befinden sich die mizellaren Aggregate in einem größeren Abstand zueinander.

Eine Erhöhung der POX/MIG-Konzentration in der Gruppe mit konstantem Verhältnis von IPA/DMIS zu Wasser (1:2) führte zu einer leichten Abnahme des Netzebenenabstandes (Abbildung 4.50). Die Netzebenenabstände von POX4020 und POX5017 wurden nicht mitberücksichtigt, da die Lage des einzigen Reflexes aufgrund der hohen Streuintensität und Reflexbreite schwer zu bestimmen und eventuell verschoben war. Da in dieser Gruppe die Konzentration an strukturbildendem Stoff erhöht wurde, hätten mehr Mizellen entstehen müssen und somit wäre eine starke Abnahme des Netzebenenabstandes zu erwarten gewesen [Holmqvist et al., 1998; Alexandridis et al., 2000].

In der letzten Gruppe wurde eine Abnahme des Netzebenenabstandes durch Erhöhung der IPA/DMIS-Konzentration beobachtet (Abbildung 4.51). Holmqvist et al. (1997) berichteten, dass je nach Polarität der lipophilen Komponente bei gleicher POX- und Wasserkonzentration, sich unterschiedliche Effekte auf den

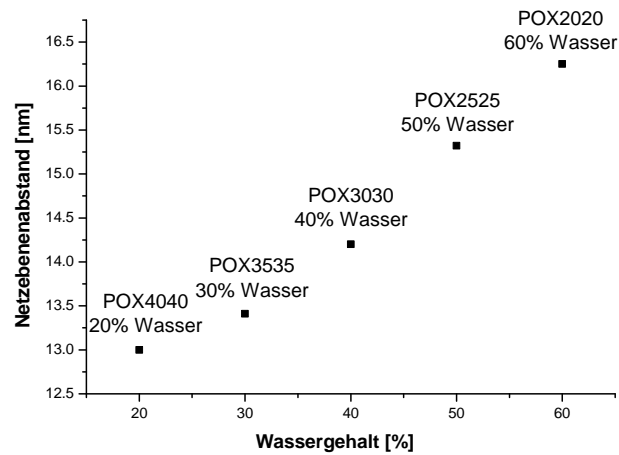


Abbildung 4.49: Einfluss des Wassergehalts auf den Netzebenenabstand

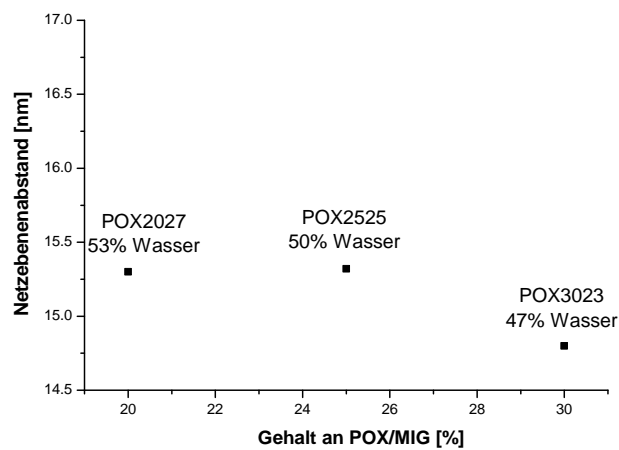


Abbildung 4.50: Einfluss des POX/MIG-Gehalts auf den Netzebenenabstand

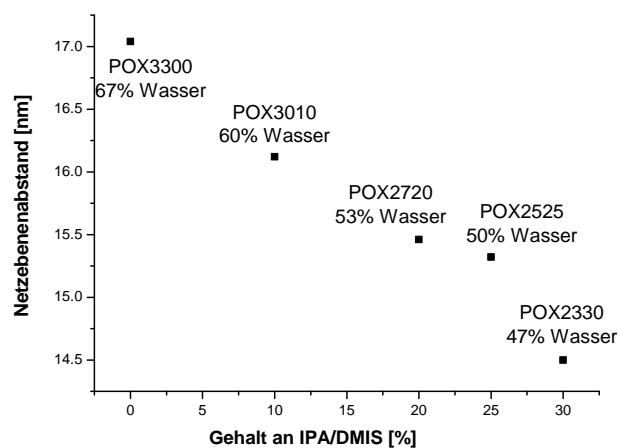


Abbildung 4.51: Einfluss des IPA/DMIS-Gehalts auf den Netzebenenabstand



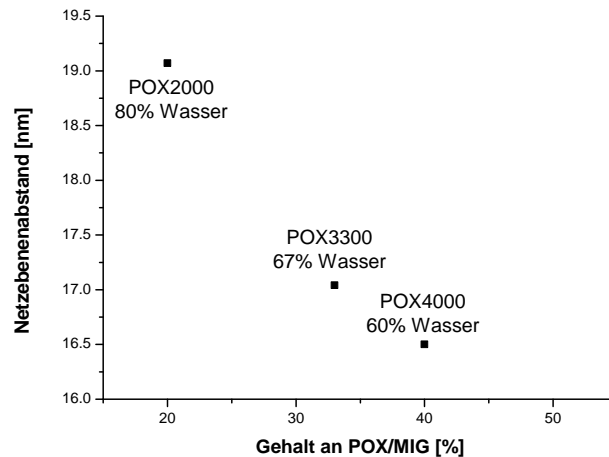


Abbildung 4.52: Einfluss vom POX/MIG- und vom Wassergehalt auf den Netzebenenabstand.

Netzebenenabstand ergeben. Rein lipophile Substanzen befinden sich ausschließlich im lipophilen Kern und vergrößern ihn damit, während lipophile Substanzen mit polaren Gruppen (wie Butanol) sich an der Grenzfläche zwischen hydrophiler Hülle und lipophilem Kern befinden. Aufgrund dieser Lokalisation innerhalb der Mikrostruktur tragen solche Stoffe nicht bzw. nur geringfügig zu einer Vergrößerung des lipophilen Kernes bei. Vielmehr könnte es sein, dass ihre oberflächenaktiven Eigenschaften eine Mitwirkung an der Stabilisierung der Grenzfläche zwischen hydrophilem Kern und lipophiler Hülle erlauben, wodurch kleinere Aggregate entstehen. Man könnte sich vorstellen, dass IPA als lipophiler Stoff mit einer polaren Gruppe einen ähnlichen Effekt auf den Netzebenenabstand hat.

Betrachtet man die Gruppe ohne IPA/DMIS, so erkennt man, dass eine Zunahme der POX/MIG-Konzentration bzw. eine Abnahme des Wassergehaltes zu einer Abnahme des Netzebenenabstandes führte (Abbildung 4.52). Dieser Effekt wurde bereits für die erste bzw. zweite Gruppe besprochen. Vergleicht man den Netzebenenabstand eines 27 %igen POX-Hydrogels (15,2 nm [Wanka et al., 1990] bzw. 16,49 nm [Wanka et al., 1994]) mit dem von POX3300, das eine POX-Konzentration von 26,4 % hat, so ist der hier gemessene Wert mit 17,04 nm etwas höher. MIG in 6,6 %iger Konzentration scheint einen erhöhenden Einfluss auf den Netzebenenabstand zu haben. Ein ähnlicher Effekt konnte für viele lipophile Substanzen beobachtet werden [Landh, 1994; Holmqvist et al., 1998; Ivanova et al., 2000b]. Diese befanden sich im ebenfalls lipophilen Kern aus Polypropylen und

vergrößerten ihn derart, dass sich auch der Abstand zwischen den Aggregaten vergrößerte.

Entscheidend für den Netzebenenabstand aller vier untersuchten Gruppen ist jedoch der Wassergehalt, wie der annähernd lineare Verlauf der Kurve in Abbildung 4.53 zeigt. Der Einfluss von Wasser als gutes Lösungsmittel für POX auf den sich ergebenden Netzebenenabstand ist deutlich: je größer der Wassergehalt, desto größer ist der Netzebenenabstand. Dieser Einfluss ist dem der anderen Bestandteile deutlich überlegen, was an den drei Systemen mit 60 % Wasser (POX2020, POX3010 und POX4000) deutlich wird: obwohl diese drei Systeme sehr unterschiedliche Zusammensetzungen besitzen, befinden sich ihre Netzebenenabstände mit jeweils 16,25 nm, 16,12 nm und 16,50 nm sehr nah beieinander. Somit könnte man sagen, dass innerhalb des untersuchten Bereiches der Einfluss der anderen Bestandteile gegenüber dem Wassereinfluss vernachlässigbar ist.

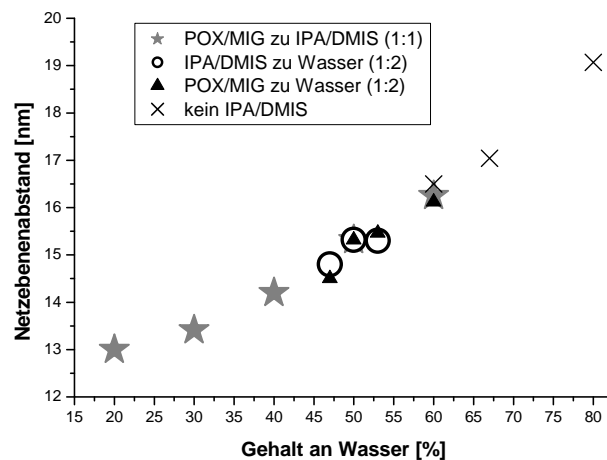


Abbildung 4.53: Einfluss des Wassergehalts auf den Netzebenenabstand

#### 4.2.4.2 Untersuchungen mit ALA und Temperatureffekte

Wie schon in den rheologischen Untersuchungen gezeigt wurde, hatte ALA einen Einfluss auf die Konsistenz der Zubereitungen. Dieser wurde von Grüning (2007) als Aussalzeffekt interpretiert. In welcher Weise die Einarbeitung von 10 % ALA den strukturellen Aufbau beeinflusst, wurde am Beispiel von POX2020, POX2330 und POX2525 untersucht. Den beiden erstgenannten Zubereitungen konnte in

Abwesenheit von ALA (s. 4.2.4.1) wegen der niedrigen Streuintensität keine definierte Raumstruktur zugeordnet werden. Abbildung 4.54 zeigt die Veränderung von POX2020 durch Einarbeiten von 10 % ALA: Lage und Intensität der Reflexe veränderten sich so, dass eine Strukturzuordnung möglich war. Im Falle des wirkstoffhaltigen POX2020 handelte es sich wahrscheinlich um eine kubisch flächenzentrierte Struktur vom Typ Fm3m. Dabei ist zu beachten, dass bei einem Wert von  $h = 0,53 \text{ nm}^{-1}$  ein Reflex zu finden ist, der zu einer primitiven Struktur gehören könnte. Es könnte also sein, dass POX2020 mit 10 % ALA eine Art Übergangsstruktur darstellt, bei der sowohl eine kubisch primitive als auch eine kubisch flächenzentrierte Struktur vertreten sind. Um genauere Aussagen treffen zu können, müsste man mehrere Zubereitungen in diesem Bereich untersuchen.

Im Falle von POX2330 kam es durch Einarbeiten von ALA in 10 %iger Konzentration ebenfalls zur Ausbildung einer geordneten Struktur. Es entstand erwartungsgemäß ein kubisch primitiver Flüssigkristall vom Typ Pn3m, da in der näheren Umgebung der Zubereitung diese kubische Struktur vorherrschte. Auch für diese Zubereitung wurde die Intensität der Reflexe größer, was den von Grüning (2007) vorgeschlagenen Aussalzeffekt von ALA unterstützte, denn durch die stärkere Wasserbindung von ALA konnten mehr POX-Assoziate zur Streuung beitragen.

Bei POX2525 hatte die wirkstofffreie Grundlage schon eine ausgebildete flüssigkristalline Struktur vom Typ Pn3m. Der Zusatz von 10 % ALA veränderte die Struktur nicht. Man könnte sagen, dass ALA als kleines gelöstes Molekül auf eine schon ausgebildete Struktur (POX2525) keinen Einfluss hatte, jedoch ein strukturbildender Einfluss durch konkurrierende Bindung von Wasser auf noch nicht ausgebildete flüssigkristalline Strukturen (POX2020 und POX2330) bestand.

In allen drei Zubereitungen führte die Einarbeitung von ALA zu einer Verschiebung des intensivsten Reflexes zu kleineren Streuvektoren und damit zu einer Vergrößerung des Netzebenenabstandes (Abbildung 4.55). Ähnliches berichteten Alexandridis et al. (2000) für Glycerol und Glucose. Sie beobachteten, dass diese hydrophilen Stoffe zur Entquellung der ebenfalls hydrophilen PE-Blöcke beitragen und somit die Grenzfläche pro PE-Block verringern. Da der Netzebenenabstand mit der Grenzfläche pro Molekül in Verbindung steht, können Stoffe, die mit den grenzflächenaktiven Molekülen interagieren, zu einer Veränderung der Grenzfläche führen und somit den Netzebenenabstand verändern.

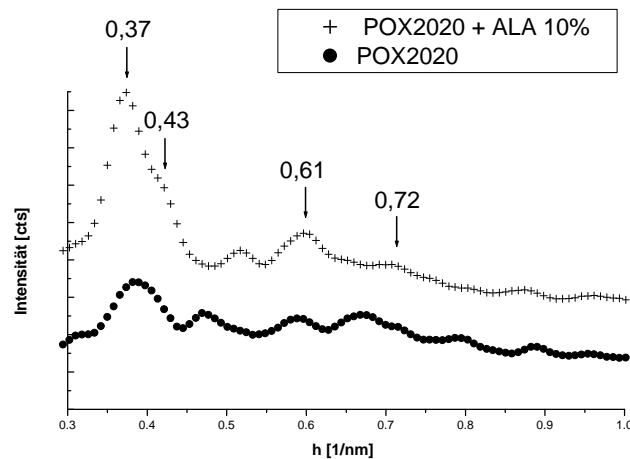


Abbildung 4.54: Einfluss von ALA auf die Struktur von POX2020.

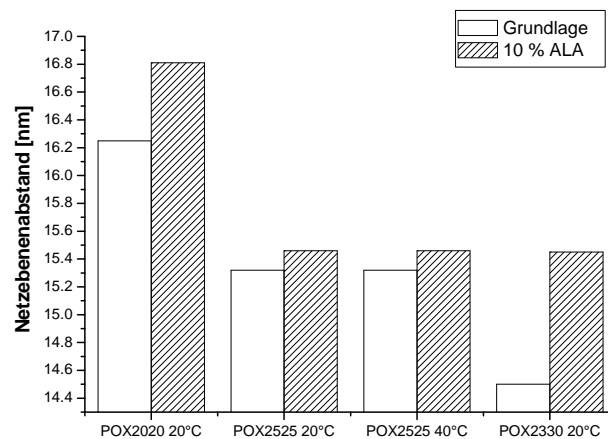


Abbildung 4.55: Einfluss von ALA auf den Netzebenenabstand von POX2020, POX2525 und POX2330 und Einfluss von Temperaturerhöhung auf die Struktur von ALA-haltigem POX2525.

Abbildung 4.55 zeigt außerdem die Netzebenenabstände von POX2525 (wirkstofffrei und ALA-haltig) bei verschiedenen Temperaturen. Während die Intensität der Reflexe mit zunehmender Temperatur anstieg, veränderte sich die Lage des Netzebenenabstandes interessanterweise nicht, obwohl der Gelierungsprozess und damit die Bildung einer kubisch flüssigkristallinen Struktur temperaturabhängig ist. Um genauere Aussagen über den Einfluss der Temperatur treffen zu können, müsste man mehrere Systeme bei verschiedenen Temperaturen untersuchen. Auf diesem Wege könnte über einen breiten Temperaturbereich der ganze Mizellierungs- und Gelierungsprozess verfolgt werden [Mortensen, 1996].

### 4.3 Untersuchungen von Poloxamer 407 verschiedener Hersteller

In diesem Kapitel wurden vier verschiedene Poloxamer 407-Chargen bzw. Zubereitungen, die mit diesen Stoffen hergestellt wurden, auf ihre physikochemischen Eigenschaften untersucht. Es standen Lutrol® F127 (LUT), Pluronic® F127 (PLU), Poloxamer 407 von Fagron (FAG) und Synperonic® PE/F127 (SYN) zur Verfügung.

#### 4.3.1 Makroskopische Charakterisierung

Für die makroskopischen Untersuchungen wurden vier Zubereitungen mit der gleichen Zusammensetzung des von Grüning entwickelten Thermogels (POX2525) mit unterschiedlichen Chargen Poloxamer 407 mithilfe der Unguatomethode hergestellt und über Nacht gelagert. Schon die makroskopische Charakterisierung zeigte erstaunliche Ergebnisse: während die Formulierungen mit LUT, PLU und FAG ein ähnliches Aussehen hatten (weißlich, cremig, glänzend, weich), war die Zubereitung, die SYN enthielt, bei Raumtemperatur flüssig. Zur detaillierten Beurteilung wurde ein pseudoternäres Mischungsdiagramm mit SYN, MIG, IPA, DMIS und Wasser aufgestellt (Abbildung 4.56) und mit dem LUT-Mischungsdiagramm

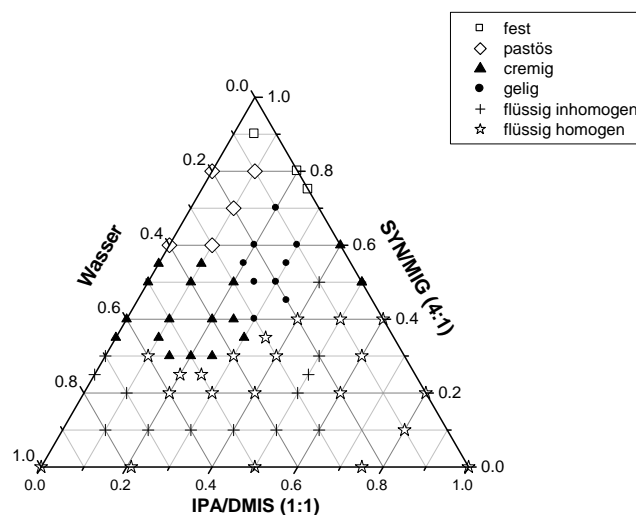


Abbildung 4.56: Makroskopische Charakterisierung der Konsistenz von Systemen auf Basis von Synperonic PE/F127 (SYN) dargestellt in einem pseudoternären Mischungsdiagramm.

(Abbildung 4.1) verglichen. Dieser Vergleich zeigte, dass der flüssige Bereich bei Verwendung von SYN und bei niedrigen IPA/DMIS-Konzentrationen (0-30 %) deutlich größer wurde, während bei größeren IPA/DMIS-Konzentrationen ( $> 30\%$ ) sich die Eigenschaften der flüssigen Zubereitungen veränderten: die Anzahl an flüssigen inhomogenen Zubereitungen nahm zugunsten von flüssigen homogenen Zubereitungen ab, wobei die letztgenannten den Bereich zu den cremigen Zubereitungen abgrenzten. Cremige Systeme nahmen bei Einsatz von SYN in dem Maße an Fläche ab, wie der Bereich flüssiger Zubereitungen zunahm. Cremige Systeme traten also bei höheren POX/MIG-Konzentrationen ( $\geq 30\%$ ) auf und waren insgesamt weniger vertreten, da die Grenze zwischen cremigen und pastösen Systemen bei niedrigeren POX/MIG-Konzentrationen lag (35 % statt 40 % bei LUT). Der Bereich von geligen Zubereitungen erforderte bei Verwendung von SYN höhere POX/MIG-Konzentrationen ( $\geq 40\%$  statt  $\geq 30\%$ ) und niedrigere IPA/DMIS-Konzentrationen (20-35 % statt 25-35 %). Dadurch wurden weniger pastöse Systeme beobachtet, wobei im Bereich dieser und der festen Systeme wegen der ungeeigneten Eigenschaften für die dermale Applikation nur wenige Zubereitungen hergestellt wurden.

#### 4.3.2 Rheologische Untersuchungen

Die schon makroskopisch erkennbaren Unterschiede sollten weiter mithilfe der Oszillationsrheologie untersucht werden. Hierfür wurde zunächst die Zusammensetzung 25 % POX/MIG (4:1), 25 % IPA/DMIS (1:1) und 50 % Wasser gewählt, für die die Parameter des linear viskoelastischen Bereiches bereits bei 32 °C für das System POX2525 (mit LUT) bestimmt worden waren (s. Kapitel 4.1.4.1). Obwohl SYN2525 bei Raumtemperatur flüssig war, erreichte dieses System bei 32 °C einen halbfesten Zustand. Somit konnte sein viskoelastischer Bereich auch bei 32 °C bestimmt werden. Bei dieser Temperatur galten für alle vier untersuchten Systeme die gleichen Parameter. Die Messungen wurden bei 0,5 Hz und 50 Pa zwischen 5 und 50 °C durchgeführt. Die Ergebnisse in Abbildung 4.57 lieferten wie erwartet einen deutlichen Unterschied zwischen SYN2525 (TGP 27,05 °C) und den restlichen drei Zubereitungen, die einen TGP um 13 °C hatten. Um zu überprüfen, ob dieses Phänomen an der komplexen Zusammensetzung der Zubereitungen

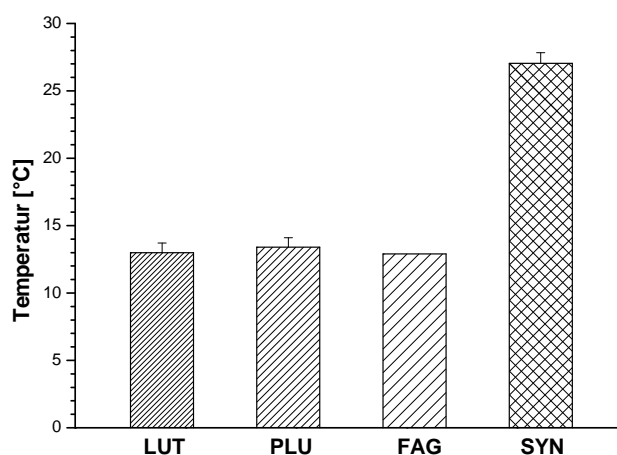


Abbildung 4.57: Bestimmung des Thermogelierungspunktes von Systemen mit 25 % POX/MIG (4:1), 25 % IPA/DMIS (1:1) und 50 % Wasser aus verschiedenen Chargen POX (Mittelwert + Standardabweichung, n=3).

bzw. an einer Interaktion zwischen den Hilfsstoffen lag, wurden binäre POX-Wasser-Gele mit SYN und LUT hergestellt und rheologisch untersucht. Dazu wurden die TGP von jeweils drei Systemen mit 20, 26 und 32 % LUT bzw. SYN bestimmt.

Makroskopisch waren bereits Unterschiede zu erkennen (Tabelle 4.14). Während bei LUT alle Zubereitungen bei Raumtemperatur halbfest waren, waren bei SYN zwei Formulierungen flüssig (SYNW2080 und SYNW2674) und eine halbfest (SYNW3268). Dieser Befund war im Einklang mit den Ergebnissen der Bestimmung des TGP, die in Abbildung 4.58 gezeigt werden. Im Vergleich beider Polymere wurde bei gleicher Konzentration ein deutlicher Unterschied der TGPs festgestellt. So gab es bei 20 % POX einen Unterschied von 30,4 °C zwischen dem LUT- und dem SYN-Gel. Dieser Unterschied wurde umso kleiner, je höher der POX-Gehalt wurde: bei 32 % POX waren es nur noch 11,6 °C Unterschied zwischen beiden TGPs. Eine Erhöhung des POX-Gehaltes führte für beide Polymere zu geringeren TGPs. Die Abnahme der TGPs fand aber in unterschiedlichem Ausmaß statt. So erfuhr der TGP eine Abnahme von 12,8 °C durch eine Erhöhung der LUT-Konzentration von 20 auf 32 %, während bei SYN zwischen den gleichen Konzentrationen eine dramatische Abnahme von 31,7 °C zu beobachten war.

Mit diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der starke Unterschied der TGPs von LUT und SYN nicht an der komplexen Zusammensetzung bzw. an einer Interaktion zwischen den Hilfsstoffen sondern am Poloxamer selbst lag. Aus diesem Grund wurden weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der verschiedenen Poloxamer 407-Typen durchgeführt.

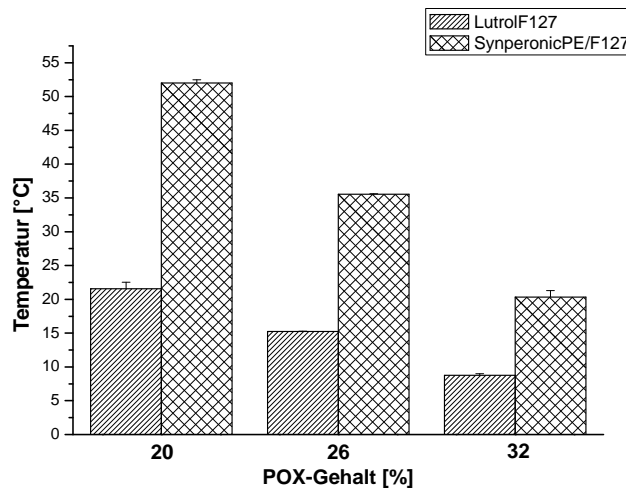


Abbildung 4.58: Abhängigkeit des Thermogelierungspunktes vom Typ und von der Konzentration von POX (Mittelwert + Standardabweichung,  $n=3$ ).

Tabelle 4.14: Zusammensetzung und Aussehen von Gelen aus Lutrol F127 (LUT), Synperonic PE/F127 (SYN) und Wasser.

Zubereitung	LUT [%]	SYN [%]	Wasser [%]	Aussehen, Konsistenz
LUTW2080	20	-	80	transparent, halbfest
LUTW2674	26	-	74	transparent, halbfest
LUTW3268	32	-	68	transparent, viele Luftblasen, halbfest
SYNW2080	-	20	80	transparent, <i>flüssig</i>
SYNW2674	-	26	74	transparent, <i>flüssig</i>
SYNW3268	-	32	68	transparent, halbfest

### 4.3.3 WAXD-Untersuchungen

Mittels WAXD lassen sich Rückschlüsse auf die Kristallstruktur von Polymeren ziehen. Sowohl diese, als auch die Kristallinität oder der Kristallisationsgrad haben einen Einfluss auf die optischen, mechanischen, thermischen und chemischen Eigenschaften des Polymers und wurden deswegen untersucht. Abbildung 4.59 zeigt die Diffraktogramme der vier POX-Chargen im Vergleich. Auf den ersten Blick sehen alle vier Diffraktogramme identisch aus. Betrachtet man die Lage und Intensität der acht charakteristischen Reflexe (Tabelle 4.15), so werden jedoch kleine Unterschiede deutlich. Zwar variierte die Position der Reflexe nur schwach (erste Nachkommastelle), womit die Identität der vier untersuchten Chargen nachgewiesen



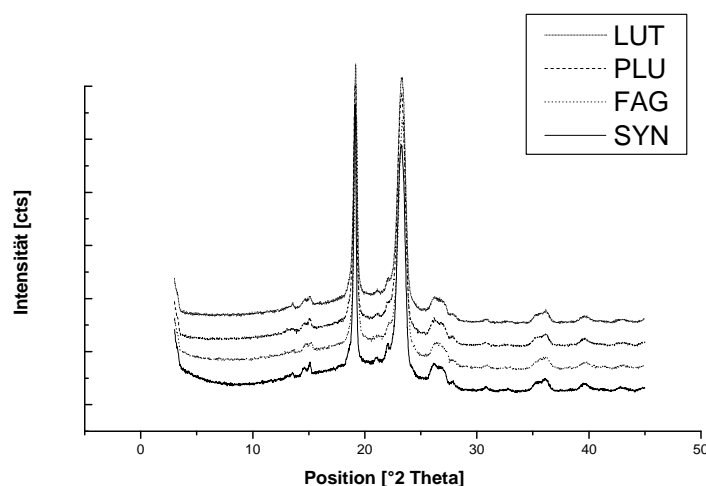


Abbildung 4.59: Kaskadendiagramm mit den WAXD-Diffraktogrammen der vier Poloxamer 407 Chargen.

Tabelle 4.15: Position und relative Intensität von 8 charakteristischen Reflexen der vier untersuchten POX Chargen.

Reflex- nummer	LUT		PLU		FAG		SYN	
	Position [°2Th.]	Rel. Intensität [%]	Position [°2Th.]	Rel. Intensität [%]	Position [°2Th.]	Rel. Intensität [%]	Position [°2Th.]	Rel. Intensität [%]
1	13,56	2,07	13,53	1,41	13,65	1,07	13,56	1,62
2	15,09	3,79	15,07	3,79	15,22	3,77	15,09	4,38
3	19,20	100	19,18	99,68	19,29	91,59	19,14	100
4	23,13	88,29	23,33	100	23,32	100	23,49	74,01
5	26,18	6,42	26,12	7,98	26,38	6,92	26,20	7,72
6	30,87	1,09	30,87	1,24	31,01	0,96	30,81	1,38
7	36,23	4,80	36,21	4,49	36,24	4,85	36,21	4,27
8	39,71	2,11	39,46	2,24	39,73	2,30	39,58	2,22

werden konnte, doch änderte sich die Intensität der genannten Reflexe (Abbildung 4.60). Vor allem war auffällig, dass die Intensität der Hauptreflexe (Reflexnummer 3 und 4, bei ca. 19 °2 $\theta$  bzw. 23 °2 $\theta$ ) stark variierte, so dass nicht immer derselbe Reflex als 100 % gesetzt werden konnte. Bei LUT und bei SYN war der erste der beiden Reflexe am größten, während es bei PLU und FAG der zweite war. Es konnte also keine Auffälligkeit nur für SYN festgestellt werden. Die unterschiedlichen Intensitäten deuteten aber auf unterschiedliche Kristallinitäten hin, die wie in 3.2.7.1 beschrieben berechnet wurden (Abbildung 4.61). Ein Vergleich zeigte, dass LUT, PLU und FAG eine ähnliche Kristallinität um ca. 33 % hatten und dass die Kristallinität

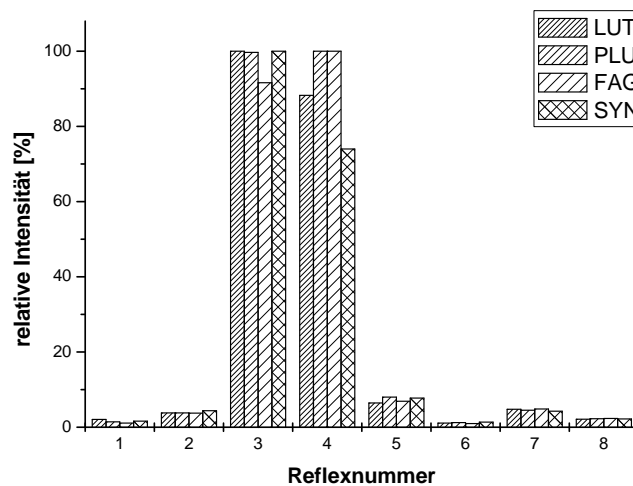


Abbildung 4.60 : Relative Intensität der acht charakteristischen Reflexe der vier untersuchten POX-Chargen.

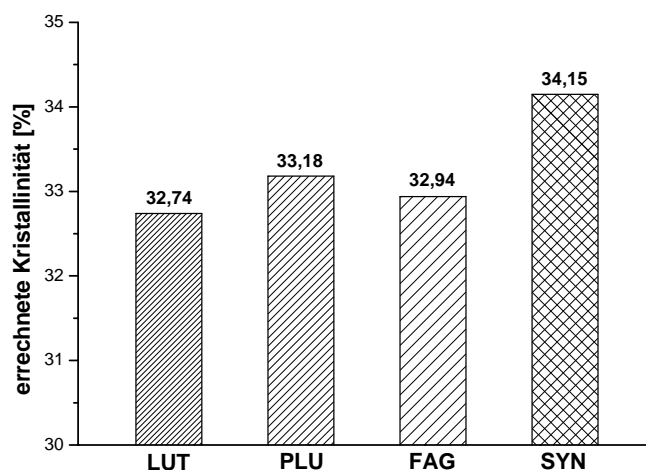


Abbildung 4.61: Vergleich der mittels WAXD errechneten Kristallinität für die vier verschiedenen POX-Chargen.

von SYN mit 34,15 % um ca. 1 % höher war. Dieser Unterschied könnte ein Grund für die unterschiedlichen Eigenschaften der halbfesten Zubereitungen sein. Die höheren kristallinen Anteile von SYN könnten eine schlechtere Löslichkeit bedeuten, so dass die Quellung des Polymers nicht so einfach stattfinden würde [Becker, 1998]. Als Folge davon hätten Systeme, die mit SYN hergestellt wurden, eine niedrigere Konsistenz. Da es jedoch um nur 1 % Unterschied bei der Kristallinität geht, müsste es weitere Gründe für die unterschiedlichen Eigenschaften geben.

#### 4.3.4 DSC-Untersuchungen

Mittels DSC kann die Energie bestimmt werden, die für die Umwandlung von festen kristallinen Strukturen in einen amorphen flüssigen Zustand nötig ist. Während dieses Vorganges schmelzen zunächst kleinere oder wenig regelmäßig aufgebaute Kristalle und im Anschluß, bei höheren Temperaturen, die größeren [Ehrenstein, 2003]. Es kann demnach die Temperatur bestimmt werden, bei der diese Umwandlung stattfindet (Schmelztemperatur), wobei dafür die Anfangstemperatur (Onset) des entstandenen endothermen Peaks herangezogen wird. Die Ergebnisse der DSC-Untersuchungen sind in Abbildung 4.62 dargestellt. Deutlich erkennbar ist die mit 51,5 °C etwas niedrigere Schmelztemperatur von SYN gegenüber ca. 53 °C bei den anderen Polymeren. Da trotz der kleinen Unterschiede alle Werte innerhalb der Spezifikationen für POX lagen, wurde angenommen, dass solche Variationen keinen großen Einfluss auf weitere Eigenschaften haben sollten. Auffällig war aber trotzdem, dass gerade SYN den niedrigsten Schmelzpunkt der vier Chargen hatte. Dieser Schmelzpunkt widerspricht dem höheren Kristallinitätswert gemäß WAXD, denn ein höher kristalliner Stoff müsste bei höheren Temperaturen schmelzen [Becker, 1998]. Aus diesem Grund wurde angenommen, dass eventuell Verunreinigungen enthalten sein könnten, die für die abweichenden Eigenschaften verantwortlich sein könnten.

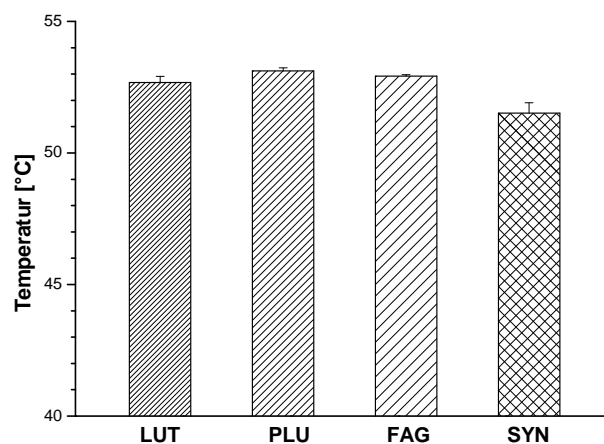


Abbildung 4.62: Bestimmung des Schmelzpunktes mittels DSC (Mittelwert + Standardabweichung, n=3).

### 4.3.5 IR-Spektroskopie

Mithilfe der IR-Spektroskopie lassen sich direkte Aussagen über Vorhandensein und Konzentration IR-aktiver funktioneller Gruppen treffen [Günzler, 2003]. Die Untersuchungen wurden durchgeführt, um zu überprüfen, ob Verunreinigungen in SYN enthalten waren, die die abweichenden Eigenschaften der mit SYN hergestellten Rezepturen gegenüber der Verwendung von POX anderer Hersteller erklären könnten. Es wurden IR-Spektren von LUT, PLU, FAG und SYN aufgenommen. Folgende Banden wurden gefunden und zugeordnet (Tabelle 4.16). Zwischen den verschiedenen Spektren waren keine deutlichen Unterschiede zu erkennen. Die genannten Banden konnten in allen vier Proben beobachtet werden. Selbst im „fingerprint“ Bereich, der wie ein Fingerabdruck einer Substanz ist, wurden keine Unterschiede festgestellt. Mittels IR-Spektroskopie ließen sich keine Banden erkennen, die einer Verunreinigung zugeordnet werden konnten. Damit konnte aber nicht das Vorhandensein jeglicher Verunreinigungen ausgeschlossen werden, sondern nur das von solchen, die IR-aktive Gruppen besitzen. Außerdem könnten niedrigkonzentrierte Verunreinigungen durch POX selbst überdeckt werden.

Tabelle 4.16: Zuordnung der IR-Banden von Poloxamer 407 [Rücker, 2001].

Gruppe	Wellenzahl [ $\text{cm}^{-1}$ ]	Art
-OH	3600-3200	Valenzschwingungen
-CH	3000-2800	Valenzschwingungen
-OH, -CH	1500-1000	Deformationsschwingungen
R-O-R	1150-1070	Schwingung der Ethergruppen

### 4.3.6 Kernspinresonanzspektroskopie ( $^1\text{H}$ -NMR)

Mittels Kernspinresonanzspektroskopie ( $^1\text{H}$ -NMR) können die elektronische Umgebung einzelner Atome und die Wechselwirkungen von diesen mit ihren Nachbaratomen erforscht werden, wodurch eine Strukturaufklärung ermöglicht wird. Die  $^1\text{H}$ -NMR-Untersuchungen wurden nur mit zwei verschiedenen POX-Chargen (LUT und SYN) durchgeführt, weil mit den davor verwendeten Methoden gezeigt

wurde, dass sich LUT kaum von den anderen zwei POX-Chargen (PLU und FAG) unterschied. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 4.63 dargestellt. Beide Proben hatten starke Signale für die Methylen- und für die Ethergruppe mit einer chemischen Verschiebung von 1,2 bzw. 3,6. Nach Lage und Größe der Hauptsignale ließen sich keine Unterschiede in den Spektren erkennen. Anhand der Nebensignale wurden jedoch Unterschiede festgestellt: bei einer chemischen Verschiebung von ca. 6,8 wurde nur bei SYN ein Signal, das einer olefinischen Gruppe zuzuordnen ist, nachgewiesen. Dieses deutete auf eine abweichende Mikrostruktur oder Zusammensetzung der beiden Polymere hin, die durch den Herstellungsprozess bedingt sein könnte, was auch das unterschiedliche Aussehen der beiden Substanzen erklären würde.

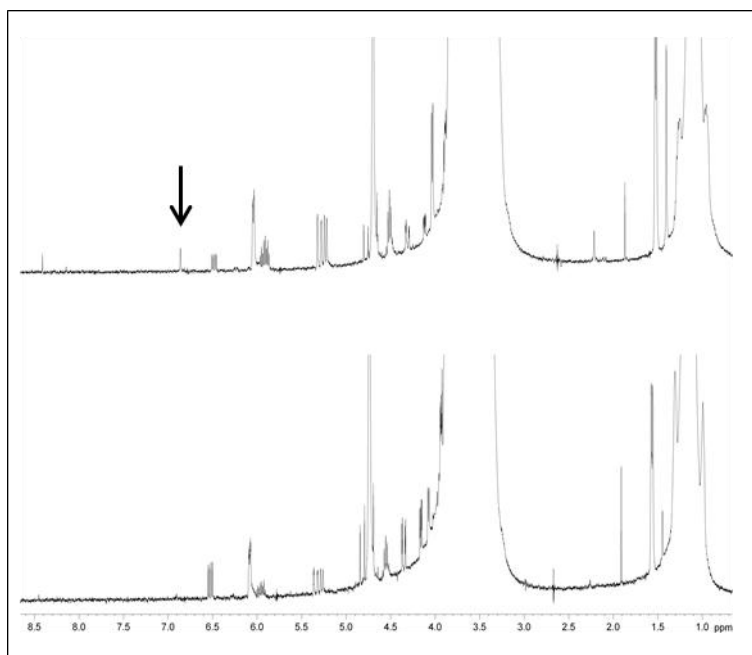


Abbildung 4.63:  $^1\text{H}$ NMR-Spektren von SYN und LUT.

## 5 Abschlussdiskussion

### 5.1 Charakterisierung eines pseudoternären Mischungsdreiecks

Die Charakterisierung eines pseudoternären Mischungsdreiecks ermöglichte die Identifizierung eines Bereichs von für die dermale Applikation geeigneten Zubereitungen. Diese zeichneten sich durch ein homogenes Aussehen, eine adäquate Konsistenz (halbfest bis hochviskos) und ein gutes Spreitungsvermögen aus. Es handelte sich dabei um cremige und gelige Zubereitungen, die zwischen 25 und 62,5 % POX/MIG, 0 und 35 % IPA/DMIS und 7,5 – 75 % Wasser enthielten. Die cremigen Zubereitungen zeigten nahezu ausnahmslos Ringing-Eigenschaften, wobei außerdem einige gelige, pastöse und feste Zubereitungen diese Eigenschaften aufwiesen. Nichtsdestotrotz wurde der Schwerpunkt auf die cremigen Zubereitungen aufgrund ihrer Applikationsfreundlichkeit gelegt. Zu feste oder flüssige Systeme sind aufgrund ihrer Konsistenz für die Applikation auf der Haut entweder ungeeignet oder nicht erwünscht.

Mittels PolMik konnte eine klare Abgrenzung zwischen isotropen und anisotropen Zubereitungen bei 20 % Wassergehalt vollzogen werden. Bei niedrigen POX-Konzentrationen (< 35 %) waren sogar nur 10 % Wasser nötig, um die Anisotropie zu verhindern. Innerhalb der anisotropen Systeme wurden solche mit klein- bzw. großflächiger Textur identifiziert und mit dem POX-Gehalt in Verbindung gebracht. Außerdem wurden Tröpfchen in flüssigen Systemen nachgewiesen, die den Emulsionscharakter verdeutlichten. Halbfeste Zubereitungen mit cremiger Konsistenz zeigten eine typische feindisperse Textur.

Mithilfe von WAXD konnte eine klare Unterscheidung zwischen röntgenamorphen und kristallinen Systemen festgestellt werden, die mit der mittels PolMik ermittelten Grenze zwischen isotropen und anisotropen Systemen fast genau übereinstimmte. Auf der wasserfreien Seite des Mischungsdreiecks zeigten die beiden Methoden jedoch unterschiedliche Ergebnisse. Während röntgenamorphe Systeme schon ab 83,5 % IPA/DMIS beobachtet wurden, waren die entsprechenden isotropen Systeme erst zwischen 90 % und 95 % IPA/DMIS im PolMik zu erkennen. Dieser Befund wurde mit der von Latsch et al. (2004) beschriebenen Empfindlichkeit der jeweiligen Methode erklärt, wobei PolMik die empfindlichere der beiden ist. Andererseits erlaubt

WAXD eine (semi)quantitative Aussage über den Anteil an kristallinem Material, weshalb die Anwendung von WAXD von Interesse ist.

Die im Anschluss durchgeführten Kristallinitätsberechnungen wiesen IPA/DMIS als schlechteres Lösungsmittelgemisch für POX im Vergleich zu Wasser nach. Laut der technischen Information vom Hersteller, BASF, sind Wasser, Ethanol und IPA gute Lösungsmittel für POX, während Ether, Paraffin und fette Öle schlechte Lösungsmittel für POX darstellen. Aus diesem Grund kann man davon ausgehen, dass die schlechten Lösungseigenschaften für POX auf DMIS im Gemisch aus IPA und DMIS zurückgeführt werden können.

Rheologisch untersucht wurden alle Zubereitungen im halbfesten und einige im flüssigen Bereich. Bezüglich der Konsistenz konnte beobachtet werden, dass der Zusatz von IPA/DMIS bei gleichbleibendem POX/MIG-Gehalt einen konsistenzmindernden Effekt hatte und dass diese Abnahme von einer makroskopischen Veränderung (Übergang von cremig über gelig zu einem flüssigen Zustand) begleitet wurde. Dabei konnte das von POX aufgebaute Netzwerk bis zu 10 % IPA/DMIS aufnehmen, ohne seine Konsistenz zu verändern, wobei der flüssige Zustand spätestens ab einem Gehalt von 40 % IPA/DMIS auftrat. Die Veränderung der Konsistenz könnte mit der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen IPA/DMIS und den PE-Ketten von POX in Verbindung gebracht werden. Wei et al. [2002] beobachteten ein ähnliches Verhalten bei der Einarbeitung von Natriumhyaluronat in einem POX-Gel und postulierten, dass die Konsistenzabnahme aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den PE-Ketten von POX und Natriumhyaluronat zustande kommt. Die eingegangenen Bindungen erschweren die Quellung des Polymers und führen somit zur Dehydratation, wodurch die POX-Mizellen kleiner werden und die Interaktionen zwischen diesen abnehmen. Auf diese Weise kommt es zu einer Abschwächung des aufgebauten Netzwerks, das für die Konsistenz des Systems verantwortlich ist. Es könnte also sein, dass die PE-Ketten Wasserstoffbrückenbindungen mit IPA oder DMIS in der Weise eingehen, dass es zu einer Konsistenzminderung kommt.

Die Bestimmung des TGP konnte nur im Konzentrationsbereich zwischen 20 und 30 % POX durchgeführt werden. Für diese Systeme kam es zu einer Abnahme des TGP durch Erhöhung des POX/MIG-Gehaltes. Die Veränderung des IPA/DMIS-Gehaltes führte bis ca. 20 – 25 % zu einer Abnahme des TGP, während danach eine sprunghafte Zunahme stattfand, die auf einem Plateau bei ca. 40 – 45 °C endete.

Wie von Pandit und McIntyre (1997) beschrieben, können Stoffe, die die CMC beeinflussen, ebenfalls Einfluss auf den TGP haben, da die Mizellbildung den ersten Schritt des Gelierungsprozesses darstellt. Die Mischung aus IPA, DMIS und MIG hatte bis zu einer Konzentration von ca. 20-25 % IPA/DMIS einen auf den TGP erniedrigenden Effekt. In diesem Konzentrationsbereich war das Verhältnis von MIG/DMIS zu IPA relativ groß. Man könnte also vermuten, dass DMIS und MIG einen auf den TGP erniedrigenden Effekt hatten und dass dieser in diesem Konzentrationsbereich dem von IPA in der Literatur beschriebenen TGP-erhöhenden Effekt überlegen war [Pandit und McIntyre, 1997]. Eine weitere Erhöhung der IPA/DMIS-Konzentration führte zu einer Erhöhung des TGP. Dies könnte damit erklärt werden, dass das Verhältnis von MIG/DMIS zu IPA kleiner wurde, so dass der TGP-erhöhende Effekt von IPA dominierte.

## **5.2 Stabilität der Systeme innerhalb des pseudoternären Mischungsdreiecks**

Bezüglich der Stabilität der untersuchten Systeme innerhalb des pseudoternären Mischungsdreiecks konnte festgestellt werden, dass die meisten über eine Lagerung von einem Jahr bei 20 °C stabil waren. Makroskopisch zeigten einige halbfeste Zubereitungen, die nah am flüssigen Bereich waren, eine Verflüssigung, die mit einer Alterung des Gerüsts bzw. einer Ostwald-Reifung mit anschließender Koaleszenz erklärt wurde. Zubereitungen mit wenig POX/MIG (< 25 %) und ohne IPA/DMIS waren mikrobiell befallen. Bei höheren POX- und IPA/DMIS-Konzentrationen kam es nicht zu einem mikrobiellen Befall. Die hohe POX-Konzentration ( $\geq 30$  %) führte wahrscheinlich durch eine starke Quellung des Polymers zu einem Wasserentzug für die Mikroorganismen, die unter diesen Bedingungen nicht optimal wachsen konnten. Schon sehr niedrige IPA/DMIS-Konzentrationen ( $\geq 5$  %) übten unerwartet einen konservierenden Effekt aus (konservierende Wirkung von IPA erst ab 15 % (V/V)). Die Kombination der Hilfsstoffe schien für die mikrobiologische Stabilität entscheidend zu sein. Um zu überprüfen, ob die Kombination der Hilfsstoffe eine konservierende Wirkung haben könnte, müsste jedoch zum Beispiel die Prüfung auf ausreichende Konservierung des Europäischen Arzneibuches durchgeführt werden. Mittels Polmik wurden ebenfalls Instabilitäten beobachtet. Die makroskopische Verflüssigung ging mit dem Verlust der mikroskopisch sichtbaren, charakteristischen



cremigen Textur und dem Erscheinen von Tröpfchen bei zwei Zubereitungen einher. Eine Vergrößerung anisotroper Texturen wurde nur bei einigen Systemen beobachtet. Es könnte jedoch sein, dass manche Systeme bereits von Anfang an so viele anisotrope Texturen aufwiesen, dass eine weitere Anisotropiezunahme nicht erkennbar war. Es wurde außerdem eine neu auftretende Anisotropie in einigen Formulierungen gefunden. Eine Erklärung hierzu konnte nicht gefunden werden, da es sich um zwei Systeme handelte, die sich innerhalb des pseudoternären Mischungsdreiecks entfernt voneinander und entfernt von Grenzen zu anderen Bereichen befanden.

Mithilfe von WAXD wurde nachgewiesen, dass die direkt nach der Herstellung gefundene Grenze zwischen röntgenamorphen und kristallinen Systemen auch bei Lagerung bestehen blieb. Im Bereich der amorphen Zubereitungen fanden über die gesamte Lagerung keine Veränderungen statt, während sich die kristallinen Systeme veränderten: jedes System zeigte eine höhere relative Kristallinität nach zwölf Monaten Lagerung. Hierbei unterschieden sich jedoch die Kristallisationsgeschwindigkeiten. Zubereitungen mit wenig POX wiesen zunächst einen langsamen Anstieg der Kristallinität und zum Schluß einen schnelleren Anstieg auf. Systeme mit mittleren POX-Gehalten zeigten eine stetige Zunahme der Kristallinität, während die Kristallinität bei höher konzentrierten Systemen anfangs schnell und später langsamer zunahm.

### **5.3 Einfluss der enthaltenen Komponenten auf ausgewählte physikochemische Eigenschaften**

Um den Einfluss einzelner Komponenten bzw. Komponentenkombinationen auf ausgewählte physikochemische Eigenschaften zu untersuchen, wurden innerhalb des Bereiches halbfester Zubereitungen aus dem pseudoternären Mischungsdreieck drei Geraden mit konstanten Mischungsverhältnissen von POX/MIG zu IPA/DMIS (1:1), von IPA/DMIS zu Wasser (1:2) und von POX/MIG zu Wasser (1:2) im Detail untersucht. Der Schnittpunkt der Geraden lag bei POX2525, einer in einer Vorgängerarbeit beschriebenen Formulierung [Grüning, 2007].

Bezüglich der Konsistenz wurde festgestellt, dass vor allem die Veränderung der Konzentration von POX/MIG und IPA/DMIS einen erheblichen Einfluss auf die

Konsistenz der Zubereitungen hatte. Die Erhöhung der POX/MIG-Konzentration führte erwartungsgemäß zu einer Erhöhung der Konsistenz. POX fungiert in den Formulierungen als Gelbildner und Konsistenzgeber. Wie von Wanka et al. (1990) beschrieben führt eine Erhöhung der POX-Konzentration zur Entstehung von mehr Aggregaten, wodurch es zur Bildung eines dichter gepackten Netzwerks kommt, das als Gelgerüst fungiert und den Systemen ihre Konsistenz verleiht.

Eine Erhöhung der IPA/DMIS-Konzentration führte zu einer Konsistenzabnahme. Wei et al. (2002) beobachteten ein ähnliches Verhalten durch Zugabe von Natriumhyaluronat zu einer POX-haltigen Formulierung. Es wurde postuliert, dass Natriumhyaluronat Wasserstoffbrückenbindungen mit den PE-Ketten von POX eingeht und sie somit dehydratisiert und entquillt. Als Folge hiervon resultieren kleinere Aggregate, die schlechter miteinander interagieren können, was sich in der verminderten Konsistenz bemerkbar macht. IPA und DMIS könnten ebenfalls mit den PE-Ketten Wasserstoffbrückenbindungen eingehen und somit eine Konsistenzminderung verursachen.

Die Einarbeitung von ALA führte bei Zubereitungen mit niedrigen Wasserkonzentrationen und hohen POX-Konzentrationen zu einer höheren Konsistenz. Ricci et al. (2002) beobachteten, dass die Affinität der von Salzen wie NaCl und  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  im wässrigen Milieu gebildeten Ionen zu Wassermolekülen höher ist, als die zu POX-Molekülen. Aus diesem Grund kommt es zur Bindung von Wasser durch die Salze und somit zu einer höheren Konsistenz aufgrund der insgesamt weniger zur Verfügung stehenden freien Wassermoleküle für die gleiche Menge an POX. Da ALA sehr gut wasserlöslich ist, könnten die dissoziierten Ionen viel Wasser binden und zum beschriebenen konsistenz erhöhenden Effekt führen. Bei niedrigen POX-Konzentrationen und höheren Wassergehalten kam es im Gegensatz dazu zu einer Erniedrigung der Konsistenz. Dieser Effekt könnte mit dem von NaCl auf die Wollwachsalkoholsalbe verglichen werden, bei dem NaCl eine räumliche Trennung durch Anlagerung an Gerüststrukturen bewirkte [Rose, 1999]. Durch die Einarbeitung von Lidocain konnten keine eindeutigen Effekte beobachtet werden. Manche Zubereitungen erfuhren eine Erhöhung der Konsistenz, während andere eine Minderung der Konsistenz erlitten. Die Inkorporierung von Lidocain in die lipophile Phase (MIG) mancher Systeme könnte zu einer Hydrophobisierung des Mizellkernes und somit zu einer erleichterten Mizellbildung, die den Gelierungsprozess fördern würde, führen, wie durch die Zugabe von mittelkettigen aliphatischen Alkoholen in

POX-Gelen von Caragheorgheopol et al. (1997) beobachtet wurde. Es könnte aber auch sein, dass die Mischung aus Lidocain und den restlichen Hilfsstoffen die Mizellisierung der POX-Systeme störte, indem zum Beispiel die Löslichkeit der lipophileren PP-Ketten verbessert wurde. Dies hätte Zubereitungen mit niedrigen Konsistenzen ergeben.

Der TGP konnte aufgrund des begrenzten Messbereiches nur für Systeme mit konstantem Mischungsverhältnis von POX/MIG zu Wasser (1:2) vollständig bestimmt werden. Es wurde beobachtet, dass es zuerst zu einer Erniedrigung und danach zu einer Erhöhung des TGP kam. Dieses Verhalten könnte auf das Zusammenspiel von IPA, DMIS und MIG zurückgeführt werden. Die Erniedrigung des TGP fand bei verhältnismässig hoher MIG-Konzentration statt. Caragheorgheopol et al. (1997) beschrieben die bessere Mizellisierung in einer Poloxamer-Lösung durch Zugabe von mittelkettigen aliphatischen Alkoholen und begründeten diese mit der Erhöhung der Hydrophobie des Mizellkernes. MIG könnte als lipophiler Stoff zu einer Hydrophobisierung des Mizellkernes führen und somit zu einer erleichterten Mizellbildung und damit zu einer (früh eintretenden) Gelierung des Systems führen. Die weitere Zunahme des IPA/DMIS-Gehaltes führte anschließend zu einem erhöhten TGP aufgrund des überwiegenden IPA-Einflusses, der von Pandit und McIntyre (1997) beschrieben wurde. Sie untersuchten den Einfluss verschiedener Cosolventien und stellten fest, dass die Zugabe von IPA die CMC in einem POX-Gel erhöhte, wodurch die Konsistenz des Systems abnahm.

Der Zusatz eines Wirkstoffes führte sowohl im Falle von ALA, als auch bei Einarbeitung von Lidocain zu einer Erniedrigung des TGP. Im Falle von ALA diene der von Grüning (2007) vorgeschlagene Aussalzeffekt als Erklärungsansatz. Aufgrund seines lipophilen Charakters ist bei Lidocain denkbar, dass es im Inneren der Mizellen solubilisiert wurde und dabei gleichzeitig Wassermoleküle von den PP-Ketten des Poloxamers verdrängt wurden. Durch diese Dehydratation resultiert eine Hydrophobisierung des Mizellkernes, die eine wichtige Voraussetzung für die Gelierung eines POX-Systems ist. Sharma et al. (2008a) beobachteten dieses Verhalten nicht nur für Lidocain, sondern auch für andere Lokalanästhetika. Sie schlugen außerdem vor, dass die Inkorporierung von Lidocain zu einer Vergrößerung des Mizellenradius und somit zu einer Erhöhung des mizellaren Volumenanteils führen könnte, was die Gelierung fördern würde.

Mittels DSC wurde der Einfluss der einzelnen Bestandteile auf die Struktur des SC über die Bestimmung von Phasenübergangstemperaturen untersucht. Zwar ergaben sich andere Zahlenwerte der Phasenübergangstemperaturen für die einzelnen Hilfsstoffe als bei Grüning (2007), doch konnte der von Grüning beschriebene synergistische Effekt der Hilfsstoffe auf die SC-Lipide bestätigt werden: alle untersuchten Zubereitungen zeigten eine signifikante Erniedrigung beider Phasenübergänge (T2 und T3) verglichen zu unbehandeltem SC. Innerhalb der drei untersuchten Reihen wurden klare Tendenzen beobachtet. So kam es zu umso größeren Verschiebungen für T2 und T3, je weniger Wasser und POX/MIG bzw. je mehr IPA/DMIS enthalten waren. Die gleichen Tendenzen konnten sowohl für die ALA-haltigen, als auch für die lidocainhaltigen Systeme beobachtet werden, wobei trotz niedriger Konzentration der Effekt der lidocainhaltigen Zubereitungen stärker ausgeprägt war. Aus diesem Grund ist zu diskutieren, dass Lidocain selbst mit Bestandteilen des SC interagierte und somit zur Verschiebung von T2 und T3 beitrug.

Die Untersuchungen mittels SAXD bestätigten, dass die als kubisch flüssigkristallin vermutete Struktur des von Grüning (2007) beschriebenen Thermogels zutraf. Im an diese Formulierung angrenzenden Bereich wurden zwei verschiedene kubisch flüssigkristalline Strukturen für die wirkstofffreien Grundlagen gefunden: bei mittleren POX/MIG-Konzentrationen (20-30 %) und IPA/DMIS-Konzentrationen kleiner als 10 % handelte es sich um eine flächenzentrierte Struktur vom Typ Fm3m, während im mittleren Bereich des Mischungsdreiecks in der direkten Umgebung des Thermogels bei 20-30 % POX/MIG und 20-30 % IPA/DMIS eine primitive Struktur vom Typ Pn3m auftrat. Flächenzentrierte Strukturen wurden für POX bisher in der Literatur nicht beschrieben. Aufgrund der Dicke von POX-Mizellhüllen, die durch dispergierte PE-Ketten zustande kommt, und der Interaktionen zwischen den Aggregaten, behauptete Mortensen (1996), dass die Bildung raumzentrierter Strukturen favorisiert wird. Flächenzentrierte Strukturen könnten demnach nur ausgebildet werden, wenn die Mizellhülle kleiner werden würde, womit die Interaktionen zwischen den Aggregaten abnehmen würden. Es könnte sein, dass die komplexe Zusammensetzung der Systeme in diesem Bereich des pseudoternären Mischungsdreiecks das Ausbilden einer dünnen Mizellhülle ermöglichte, so dass die Aggregate flächenzentriert angeordnet waren.

Bei kubisch primitiven Strukturen befindet sich eine POX-Mizelle jeweils an den Ecken der würfelförmigen Elementarzelle. Solche Strukturen wurden schon von mehreren Autoren beschrieben und kamen durch Einarbeitung verschiedener Zusatzstoffe in POX-Gelen zustande. Ivanova et al. (2000b) erklärten, dass diese Strukturen Variationen in der Zusammensetzung bis zu einem bestimmten Punkt tolerieren, bis sich andere Flüssigkristalle wie hexagonale und lamellare entwickeln. In den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Systemen blieb die Entwicklung anderer Flüssigkristalle aus, wie die ausführlichen PolMik-Untersuchungen zeigten. Wahrscheinlich bot die komplexe Zusammensetzung der Systeme nicht die benötigten Bedingungen für die Ausbildung anderer Strukturen an.

Für zwei Zubereitungen (POX3535 und POX4040) konnten jeweils nur zwei Reflexe nachgewiesen werden, so dass eine genaue Zuordnung zu einem definierten Flüssigkristalltyp nicht möglich war. Die Lage der zwei Reflexe könnte sowohl einer kubischen raumzentrierten Struktur vom Typ  $Im3m$  als auch einer kubischen primitiven Struktur vom Typ  $Pn3m$  zugeordnet werden. Da beide Zubereitungen gelig und nicht cremig wie die restlichen untersuchten Systeme waren und die niedrigsten Netzebenenabstände (13,00 bzw. 13,41 nm) innerhalb der untersuchten Systeme hatten, könnte es sein, dass sie zu einer kubischen raumzentrierten Struktur gehörten.

Die Überprüfung der Netzebenenabstände im Detail ergab einen nahezu linearen Zusammenhang zwischen der Wasserkonzentration und dem Netzebenenabstand. Da Wasser im Vergleich zu den restlichen Bestandteilen ein gutes Lösungsmittel für POX darstellt, dominierte der Einfluss von Wasser über den der anderen Bestandteile, was am Beispiel der drei Systeme mit 60 % Wasser (POX2020, POX3010 und POX4000) verdeutlicht werden konnte. Trotz der sehr unterschiedlichen Zusammensetzung (20 – 40 % POX/MIG und 0 – 20 % IPA/DMIS), lagen die Netzebenenabstände mit jeweils 16,25, 16,12 und 16,50 nm sehr nah beieinander. Der Einfluss von POX/MIG und IPA/DMIS auf den Netzebenenabstand schien somit gegenüber dem Wassereinfluss vernachlässigbar zu sein.

## 5.4 Korrelation zwischen den untersuchten physikochemischen Eigenschaften

Ziel war es bei gegebener Korrelation von Permeation und einem physikochemischen Parameter, diesen als leicht bestimmbare Kenngröße für Voraussagen zur Permeation zu nutzen. Es wurde daher geprüft, ob die untersuchten physikochemischen Parameter mit den Permeationsergebnissen korrelierten.

Bezüglich der komplexen Viskosität wurde für Zubereitungen mit ALA eine Korrelation zwischen einer „mittleren Konsistenz“ (8000-10000 Pas) und einem „guten“ Permeationsflux festgestellt. Dies überraschte insofern, als dass Zubereitungen mit niedriger Viskosität die Permeation eines Wirkstoffes durch die vereinfachte Diffusion aus der Formulierung begünstigen sollten. So zeigten Zubereitungen mit niedriger komplexer Viskosität (zwischen 3500 und 7000 Pas) bei Anwesenheit von Lidocain zwar die besseren Permeationsergebnisse, doch gab es Zubereitungen mit noch niedrigeren komplexen Viskositäten, die sehr schlechte permeationsfördernde Eigenschaften zeigten. Daher schien die komplexe Viskosität kein geeigneter Parameter für die Vorhersage einer Permeationsverbesserung zu sein.

Die DSC-Untersuchungen zeigten zwar deutliche Tendenzen, diese ließen sich aber nur bedingt mit den Ergebnissen der Permeationsuntersuchungen korrelieren. Während POX2027, POX2330 und POX3030 die Zubereitungen mit den größten Verschiebungen für die Phasenübergänge waren, befanden sich die beiden letztgenannten im mittleren Feld bei den Permeationsuntersuchungen mit Lidocain. Eine Ausnahme war lidocainhaltiges POX2027, das sowohl in der DSC-Untersuchung als auch im Permeationsexperiment die stärksten Effekte zeigte. Bei Einarbeitung von ALA waren POX2720 und POX3023 die Zubereitungen mit den besten Permeationsfluxen. In den DSC-Untersuchungen zeigten diese jedoch nur mittlere bzw. geringe Verschiebungen der Phasenübergangstemperaturen.

Bei einer Permeationsuntersuchung wird die Menge an Wirkstoff quantifiziert, die durch das isolierte SC diffundiert, während die DSC-Untersuchungen auf Veränderungen von Hautstrukturen hinweisen. Im idealen Fall müssten beide Methoden ähnliche Ergebnisse liefern, denn eine Zubereitung, die einen starken Einfluss auf Hautstrukturen hat, müsste mehr Wirkstoff durch die veränderte Haut

durchschleusen können. Da die DSC-Untersuchung jedoch nicht Faktoren wie z.B. die Affinität des Wirkstoffes zum Vehikel bzw. die Freisetzung des Wirkstoffes aus dem Vehikel berücksichtigt, kann es zu widersprüchlichen Ergebnissen zwischen beiden Untersuchungsmethoden kommen.

Mittels SAXD wurde eine Korrelation für die ALA-Permeation gefunden. Alle Systeme mit guten Permeationsfluxen waren kubisch flüssigkristallin und gehörten einem der nachgewiesenen Strukturtypen an. Es schien also, dass die flüssigkristalline Struktur mit der Permeationsverbesserung in Verbindung stand und dass dies unabhängig von der Art der kubischen Struktur war. Für Lidocain gab es im Unterschied zu diesem Befund jedoch keine Korrelation. Hier waren eher Systeme, bei denen die kubische Flüssigkristallstruktur nicht nachgewiesen werden konnte, diejenigen mit den besseren Permeationsfluxen. Dieser Unterschied könnte an den unterschiedlichen Eigenschaften beider Wirkstoffe liegen: ALA als hydrophiles Molekül befand sich wahrscheinlich in der hydrophilen Hülle der POX-Mizellen und stand im direkten Kontakt mit IPA und DMIS, so dass es sein könnte, dass ALA über einen sogenannten „solvent drag“ Mechanismus durch die Haut geschleust wurde. Lidocain als lipophiler Wirkstoff war wahrscheinlich im lipophilen Kern der POX-Assoziate eingeschlossen, so dass seine Diffusion von der flüssigkristallinen Struktur behindert wurde. Diese These könnte erklären, weshalb es zu einer erleichterten Freisetzung und Permeation aus Systemen kam, in denen die flüssigkristallinen Strukturen noch nicht vollständig ausgebildet waren. Da detaillierte SAXD-Untersuchungen hauptsächlich mit den wirkstofffreien Grundlagen durchgeführt wurden, sind Aussagen nur bedingt möglich, denn der Effekt von Lidocain auf die flüssigkristalline Struktur ist nicht bekannt. Im Falle der 3 untersuchten ALA-haltigen Zubereitungen kam es zu einer Strukturverfestigung im Vergleich zu den entsprechenden wirkstofffreien Grundlagen. Lidocain könnte ebenfalls zu einer Strukturverfestigung über eine Hydrophobisierung des Mizellkernes führen, wie von Sharma et al. (2008a) beobachtet wurde. Um diese These zu bestätigen, müssten jedoch genauere Untersuchungen mit den wirkstoffhaltigen Zubereitungen durchgeführt werden.

## 5.5 Chargenkonformität von Poloxamer 407 verschiedener Hersteller

Bezüglich der Konformität verschiedener Chargen Poloxamer 407 konnte nachgewiesen werden, dass zwei verschiedene Qualitäten im Handel sind, die zwar den gestellten Arzneibuchanforderungen für Poloxamer 407 entsprechen, aber bei Verarbeitung unterschiedliche Produkteigenschaften zur Folge haben. So waren SYN-Zubereitungen erst bei höheren POX/MIG- bzw. POX-Konzentrationen als bei den Poloxameren der übrigen Hersteller (LUT, PLU und FAG) halbfest. Dementsprechend zeigten Systeme auf SYN-Basis einen niedrigeren TGP bei vergleichbarer Zusammensetzung.

Der Grund für diese Unterschiede wurde mit verschiedenen Methoden untersucht. WAXD-Untersuchungen zeigten, dass die Kristallinität von SYN um etwa 1 % höher war als die für die anderen drei Qualitäten. Dies könnte eine schlechtere Löslichkeit und somit eine erschwerte Quellung des Polymers bedeuten, womit Systeme mit der gleichen SYN-Konzentration niedrigviskoser wären als Systeme, die mit POX der übrigen Hersteller zubereitet wurden. Die erhöhte Kristallinität von SYN widersprach jedoch dem mittels DSC ermittelten Schmelzpunkt, denn stärker kristalline Substanzen müssten einen höheren Schmelzpunkt haben [Becker, 1998]. Aus diesem Grund wurde postuliert, dass eventuell vorhandene Verunreinigungen für die unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften verantwortlich sein könnten. Die IR-Untersuchungen ließen jedoch keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Chargen feststellen. Mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Untersuchungen wurden zwar die gleichen Hauptsignale für die Methylen- und für die Ethergruppe mit einer chemischen Verschiebung von 1,2 bzw. 3,6 gefunden, aber anhand der Nebensignale konnte ein Unterschied identifiziert werden: bei einer chemischen Verschiebung von ca. 6,8 kam nur bei SYN ein Signal vor, das einer olefinischen Gruppe zugeordnet werden konnte. Dieses deutete auf eine abweichende Zusammensetzung oder Mikrostruktur der beiden Polymere hin, die durch den Herstellungsprozess bedingt sein könnte, was auch das unterschiedliche Aussehen der beiden Substanzen erklären würde.



## 6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine ausführliche physikochemische Charakterisierung wirkstofffreier und –haltiger Grundlagen auf Poloxamer 407 (POX)-Basis. Als Arzneistoffe wurden 5-Aminolävulinsäure (ALA) zur Applikation in der Photodynamischen Therapie und Lidocain als Lokalanästhetikum ausgewählt. Basierend auf einer makroskopischen Charakterisierung wurden Zubereitungen mit geeigneter Konsistenz für eine dermale Applikation identifiziert. Mittels Polarisationsmikroskopie und Röntgenweitwinkelbeugung konnte eine Grenze zwischen isotropen und anisotropen bzw. zwischen röntgenamorphen und kristallinen Systemen bei einem definierten Wassergehalt von ca. 10 % Wasser beobachtet werden. Der Vergleich der Diffraktogramme des reinen POX und der anisotropen Systeme machte deutlich, dass die Anisotropie auf kristallines POX zurückzuführen war. Ferner wurde festgestellt, dass die Mischung aus Isopropanol (IPA) und Dimethylisobutylcarbitol (DMIS) schlechtere Lösungseigenschaften für POX als Wasser hatte. Rheologische Untersuchungen ergaben, dass die Konsistenz der Systeme umso höher wurde, je höher der POX/MIG- und je niedriger der IPA/DMIS-Gehalt war. Bis zu einem Gehalt von ca. 20-25 % IPA/DMIS nahm die Gelierungstemperatur ab und erreichte bei höheren Gehalten ein Plateau bei ca. 45 °C. Stabilitätsuntersuchungen mit den gleichen Methoden zeigten, dass die meisten Zubereitungen über einen Lagerzeitraum von zwölf Monaten stabil waren. Nur wenige Zubereitungen ohne ausreichenden IPA-Anteil waren mikrobiologisch instabil, während wenige andere physikochemische Instabilitäten aufwiesen. Außerdem zeigte WAXD, dass innerhalb der anisotropen Zubereitungen eine Zunahme der Kristallinität stattfand, während fast alle röntgenamorphen Systeme unverändert blieben.

Rheologische Untersuchungen der halbfesten Zubereitungen zeigten, dass die Inkorporierung von ALA die komplexe Viskosität erhöhte, während für Lidocain kein signifikanter Einfluss auf die komplexe Viskosität beobachtet wurde. Bezüglich der ALA-Permeation wurden zwei Zubereitungen mittlerer Konsistenz gefunden (POX3023 und POX2720) die dem von Grüning (2007) entwickelten Thermogel (POX2525) überlegen waren. Für Lidocain hatten außer POX2525 zwei andere niedrigviskosere Zubereitungen gute permeationsfördernde Eigenschaften (POX2027 und POX2020). DSC-Untersuchungen konnten nachweisen, dass alle

Zubereitungen dazu in der Lage waren, die Phasenübergänge T2 und T3 gegenüber unbehandeltem Stratum corneum signifikant zu verschieben. Die besten Ergebnisse ergaben sich bei niedrigen POX/MIG- und Wasser-Gehalten bzw. hohen IPA/DMIS-Konzentrationen. SAXD-Untersuchungen konnten nachweisen, dass die halbfesten Zubereitungen mindestens zwei verschiedene kubisch flüssigkristalline Strukturen aufwiesen und dass POX2525 eine primitive Struktur vom Typ Pn3m zugewiesen werden konnte. Alle kubisch flüssigkristallinen Zubereitungen zeigten außerdem gute Permeationsfluxe für ALA, während Lidocain besser aus Systemen ohne ausgebildete flüssigkristalline Struktur permeierte.

Bezüglich der Chargenkonformität konnte nachgewiesen werden, dass POX der Firma Croda (Synperonic PE/F127) trotz konformer Erfüllung der Arzneibuch-Anforderungen Zubereitungen mit niedrigerer Viskosität ergab als Zubereitungen mit der gleichen POX-Konzentration anderer Hersteller. Mittels  $^1\text{H}$ -NMR nachgewiesene Begleitsubstanzen, die wahrscheinlich durch die Herstellungsweise bedingt sind, kommen als Ursache für die abweichenden Eigenschaften in Betracht.

## 7 Literaturverzeichnis

- ALEXANDRIDIS, P., IVANOVA, R., LINDMAN, B. (2000) Effect of Glycols on the Self-Assembly of Amphiphilic Block Copolymers in Water. 2. Glycol Location in the Microstructure. *Langmuir* 16: 3676-3689.
- ALLISON, R. R., DOWNIE, G. H., CUENCA, R., HU, X.-H., CHILDS, C. J. H., SIBATA, C. H. (2004) Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 1: 27-42.
- ANON, A. (2002) O/W Emulsion Based on Sodium Polyacrylate. *Res. Disclosure* 464: 2280-2281.
- AOYAGI, T., TERASHIMA, O., NAGASE, Y., MATSUI, K. (1991) Preparation of a polymer containing hexadecylpyridinium bromide groups and its utilization as a transdermal drug penetration enhancer *Polymer* 32: 2106-2111.
- AOYAGI, T., TERASHIMA, O., SUZUKI, N., MATSUI, K., NAGASE, Y. (1990) Polymerization of benzalkonium chloride-type monomer and application to percutaneous drug absorption enhancer *Journal of Controlled Release* 13: 63-71.
- ARTZNER, F., GEIGER, S., OLIVIER, A., ALLAIS, C., FINET, S., AGNELLY, F. (2007) Interactions between poloxamers in aqueous solutions: micellization and gelation studied by differential scanning calorimetry, small angle X-ray scattering, and rheology. *Langmuir* 23: 5085-5092.
- ASHTON, P., K.A., W., BRAIN, K. R., HADGRAFT, J. (1992) Surfactant effects in percutaneous absorption I. Effects on the transdermal flux of methyl nicotinate. *International Journal of Pharmaceutics* 87: 261-264.
- AUNER, B. G., VALENTA, C., HADGRAFT, J. (2003) Influence of lipophilic counter-ions in combination with phloretin and 6-ketocholestanol on the skin permeation of 5-aminolevulinic acid. *Int J Pharm* 255: 109-116.
- BABILAS, P., LANDTHALER, M., SZEIMIES, R. M. (2006) Photodynamic therapy in dermatology. *Eur J Dermatol* 16: 340-348.
- BABITA, K., KUMAR, V., RANA, V., JAIN, S., TIWARY, A. K. (2006) Thermotropic and spectroscopic behavior of skin: relationship with percutaneous permeation enhancement. *Curr Drug Deliv* 3: 95-113.
- BACH, M., LIPPOLD, B. C. (1998) Percutaneous penetration enhancement and its quantification. *Eur J Pharm Biopharm* 46: 1-13.
- BARICHELLO, J. M., MORISHITA, M., TAKAYAMA, K., NAGAI, T. (1999) Absorption of insulin from pluronic F-127 gels following subcutaneous administration in rats. *Int J Pharm* 184: 189-198.
- BARRY, B. W. (1983) *Dermatological Formulations*
- BARRY, B. W. (1987) Mode of action of Penetration Enhancers in Human Skin. *Journal of Controlled Release* 6: 85-97.
- BARRY, B. W. (1991) Lipid-Protein-Partitioning theory of skin penetration enhancement. *J Control Release* 15: 237-248.
- BASF. (2005) Lutrol F127 Thickening agent and gel former for the pharmaceutical industry.
- BAUER, K. H., FRÖMMING, K.-H., FÜHRER, C. (2006) *Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie*
- BECKER, G. W., BOTTENBRUCH, L., BINSACK, R., BRAUN, D. (1998) *Technische Thermoplaste*. 4. Polyamide

- biolitec AG, biological technology. (2005) Foscan® in der Photodynamischen Therapie
- BOEHNCKE, W. H., KAUFMANN, R. (1996) [Photodynamic therapy at the threshold of clinical use in disseminated dermatoses]. *Hautarzt* 47: 825-831.
- BOUWSTRA, J., GOORIS, G. S., BRAS, W. (1993) III. New insights in the lipid structure of the skin barrier. Dermal and transdermal drug delivery
- BOUWSTRA, J., GOORIS, G., PONEC, M. (2002) The lipid organisation of the skin barrier: Liquid and crystalline domains coexist in lamellar phases. *Journal of Biological Physics* 28: 221-223.
- BOUWSTRA, J., GOORIS, G. S., SALOMONS-DE VRIES, M. A., VAN DER SPEK, J. A., BRAS, W. (1992) Structure of human stratum corneum as a function of temperature and hydration: A wide-angle X-ray diffraction study. *Int J Pharm Dev Technol* 84: 205-216.
- BOUWSTRA, J., DE VRIES, M. A., GOORIS, G. S., BRAS, W., BRUSSEE, J., PONEC, M. (1991a) Thermodynamic and structural aspects of the skin barrier. *J Control Release* 15: 209-220.
- BOUWSTRA, J. A., GOORIS, G. S., VAN DER SPEK, J. A., BRAS, W. (1991b) Structural investigations of human stratum corneum by small-angle X-ray scattering. *J. Invest. Dermatol.* 97: 1005-1012.
- BRINKMANN, I., MÜLLER-GOYMAN, C. C. (2003) Role of isopropyl myristate, isopropyl alcohol and a combination of both in hydrocortisone permeation across the human stratum corneum. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 16: 393-404.
- BUTLER, A. R., GEORGE, S. (1992) The nonenzymatic cyclic dimerisation of 5-aminolevulinic acid. *Tetrahedron* 48: 7879-7886.
- CABANA, A., AIT-KADI, A., JUHASZ, J. (1997) Study of the Gelation Process of Polyethylene Oxidea - Polypropylene Oxideb -Polyethylene Oxidea Copolymer (Poloxamer 407) Aqueous Solutions. *J Colloid Interface Sci* 190: 307-312.
- CARAGHEORGHEOPOL, A., CALDARARU, H., DRAGUTAN, I., JOELA, H., BROWN, W. (1997) Micellization and Micellar Structure of a Poly(ethylene oxide)/Poly(propylene oxide)/Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymer in Water Solution, As Studied by the Spin Probe Technique. *Langmuir*, 1997, 13 (26), pp 6912–6921 13: 6912-6921.
- CASAS, A., FUKUDA, H., DI VENOSA, G., BATLLE, A. M. (2000) The influence of the vehicle on the synthesis of porphyrins after topical application of 5-aminolaevulinic acid. Implications in cutaneous photodynamic sensitization. *Br J Dermatol* 143: 564-572.
- CASAS, A., PEROTTI, C., SACCOLITI, M., SACCA, P., FUKUDA, H., BATLLE, A. M. (2002) ALA and ALA hexyl ester in free and liposomal formulations for the photosensitisation of tumour organ cultures. *Br J Cancer* 86: 837-842.
- CERCHIARA, T., LUPPI, B., BIGUCCI, F., ORIENTI, I., ZECCHI, V. (2002) Physically cross-linked chitosan hydrogels as topical vehicles for hydrophilic drugs. *J Pharm Pharmacol* 54: 1453-1459.
- CHARRUEAU, C., TULEU, C., ASTRE, V., GROSSIORD, J. L., CHAUMEIL, J. C. (2001) Poloxamer 407 as a thermogelling and adhesive polymer for rectal administration of short-chain fatty acids. *Drug Dev Ind Pharm* 27: 351-357.
- CHIEN, Y. W., XU, H. L., CHIANG, C. C., HUANG, Y. C. (1988) Transdermal controlled administration of indomethacin. I. Enhancement of skin permeability. *Pharm Res* 5: 103-106.
- CHOUDHARY, S., NOURI, K., ELSAIE, M. L. (2009) Photodynamic therapy in dermatology: a review. *Lasers Med Sci* 24: 971-980.
- CHUTIMAWORAPAN, S., RITTHIDEJ, G. C., YONEMOCHI, E., OGUCHI, T., YAMAMOTO, K. (2000) Effect of water-soluble carriers on dissolution characteristics of nifedipine solid dispersions. *Drug Dev Ind Pharm* 26: 1141-1150.

- CHWILKOWSKA, A., SACZKO, J., MODRZYCKA, T., MARCINKOWSKA, A., MALARSKA, A., BIELEWICZ, J., PATALAS, D., BANAS, T. (2003) Uptake of photofrin II, a photosensitizer used in photodynamic therapy, by tumour cells in vitro. *Acta Biochim Pol* 50: 509-513.
- CORNWELL, P. A., BARRY, B. W., STODDART, C. P., BOUWSTRA, J. A. (1994) Wide-angle X-ray diffraction of human stratum corneum: Effects of hydration and terpene enhancer treatment. *J Pharm Pharmacol* 46: 938-950.
- DALTON, J. T., YATES, C. R., YIN, D., STRAUGHN, A., MARCUS, S. L., GOLUB, A. L., MEYER, M. C. (2002) Clinical pharmacokinetics of 5-aminolevulinic acid in healthy volunteers and patients at high risk for recurrent bladder cancer. *J Pharmacol Exp Ther* 301: 507-512.
- DANIELL, M. D., HILL, J. S. (1991) A history of photodynamic therapy. *Aust N Z J Surg* 61: 340-348.
- DE ROSA, F. S., MARCHETTI, J. M., THOMAZINI, A. C., TEDESCO, A. C., LOPEZ, R. F. V., BENTLEY, M. V. L. B. (2000) A vehicle for photodynamic therapy of skin cancer: influence of dimethylsulphoxide on 5-aminolevulinic acid in vitro cutaneous permeation and in vivo protoporphyrin IX accumulation determined by confocal microscopy *Journal of Controlled Release* 65: 359-366.
- DE ROSA, F. S., TEDESCO, A. C., LOPEZ, R. F. V., PIERRE, M. B. R., LANGE, N., MARCHETTI, J. M., ROTTA, J. C. G., BENTLEY, M. V. L. B. (2003) In vitro skin permeation and retention of 5-aminolevulinic acid ester derivatives for photodynamic therapy *Journal of Controlled Release* 89: 261-269.
- DESAI, S. D., BLANCHARD, J. (2000) Pluronic F127-based ocular delivery system containing biodegradable polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules of pilocarpine. *Drug Deliv* 7: 201-207.
- DIMITROVA, E., BOGDANOVA, S., MITCHEVA, M., TANEV, I., MINKOV, E. (2000) Development of model aqueous ophthalmic solution of indomethacin. *Drug Dev Ind Pharm* 26: 1297-1301.
- DONNELLY, R. F., MCCARRON, P. A., WOOLFSON, A. D. (2005) Drug delivery of aminolevulinic acid from topical formulations intended for photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 81: 750-767.
- DONNELLY, R. F., MORROW, D. I., MCCARRON, P. A., JUZENAS, P., WOOLFSON, A. D. (2006) Pharmaceutical analysis of 5-aminolevulinic acid in solution and in tissues. *J Photochem Photobiol B* 82: 59-71.
- DOUGHERTY, T. J. (1987) Photosensitizers: therapy and detection of malignant tumors. *Photochem Photobiol* 45: 879-889.
- DOUGHERTY, T. J., GRINDEY, G. B., FIEL, R., WEISHAUP, K. R., BOYLE, D. G. (1975) Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *J Natl Cancer Inst* 55: 115-121.
- DUMORTIER, G., GROSSIORD, J. L., AGNELY, F., CHAUMEIL, J. C. (2006) A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm Res* 23: 2709-2728.
- DUSA Pharmaceuticals Inc. (2010) Product Information Levulan® Kerastick®
- EDELSON, R. L. (1988) Light-activated drugs. *Sci Am* 259: 68-75.
- EHRENSTEIN, G. W., RIEDEL, G., TRAWIEL, P. (2003) Praxis der thermischen Analyse von Kunststoffen
- EL-KATTAN, A. F., ASBILL, C. S., KIM, N., MICHNIAK, B. B. (2000) Effect of formulation variables on the percutaneous permeation of ketoprofen from gel formulations. *Drug Deliv* 7: 147-153.
- ELFSSON, B., WALLINA, I., EKSBORGA, S., RUDAEUSA, K., ROSB, A. M., EHRSSONA, H. (1999) Stability of 5-aminolevulinic acid in aqueous solution *European Journal of Pharmaceutical Science* 7: 87-91.

- ELIAS, P. M. (1983) Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol* 80: 44s-49s.
- ESCOBAR-CHAVEZ, J. J., QUINTANAR-GUERRERO, D., GANEM-QUINTANAR, A. (2005) In vivo skin permeation of sodium naproxen formulated in pluronic F-127 gels: effect of Azone and Transcutol. *Drug Dev Ind Pharm* 31: 447-454.
- ESCOBAR-CHÁVEZ, J. J., LÓPEZ-CERVANTES, M., NAÏK, A., KALIA, Y. N., QUINTANAR-GUERRERO, D., GANEM-QUINTANAR, A. (2006) Applications of Thermoreversible Pluronic F-127 Gels in Pharmaceutical Formulations. *J Pharm Pharmaceut Sci* 9: 339-358.
- Europäisches Arzneibuch (2008) 6. Ausgabe.
- Fachinformation Metvix®. (2008) Fachinfo Service, [www.fachinfo.de](http://www.fachinfo.de) (Stand: Juli 2008)
- Fachinformation Visudyne®. (2008) Fachinfo Service, [www.fachinfo.de](http://www.fachinfo.de) (Stand: Mai 2008)
- FANG, J. Y., LEU, Y. L., WANG, Y. Y., TSAI, Y. H. (2002) In vitro topical application and in vivo pharmacodynamic evaluation of nonivamide hydrogels using Wistar rat as an animal model. *Eur J Pharm Sci* 15: 417-423.
- FAWAZ, F., KOFFI, A., GUYOT, M., MILLET, P. (2004) Comparative in vitro-in vivo study of two quinine rectal gel formulations. *Int J Pharm* 280: 151-162.
- FIEDLER, H. P. (2007) Encyclopedia of Excipients 6<sup>th</sup> Edition.
- FONTELL, K., MANDELL, L., EKWALL, P. (1968) Some Isotropic Mesophases in Systems Containing Amphiphilic Compounds. *Acta. Chem. Scand.* 22: 3209-3223.
- FOOTE, C. S. (1968) Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. *Science* 162: 963-970.
- FORSLIND, B. (1994) A domain mosaic model of the skin barrier. *Acta dermato-venereologica* 74: 1-6.
- FOTINOS, N., CAMPO, M. A., POPOWYCZ, F., GURNY, R., LANGE, N. (2006) 5-Aminolevulinic acid derivatives in photomedicine: Characteristics, application and perspectives. *Photochem Photobiol* 82: 994-1015.
- FRANZ, T. J. (1975) Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. *J Invest Dermatol* 64: 190-195.
- FRITSCH, C., GOERZ, G., RUZICKA, T. (1998) Photodynamic therapy in dermatology. *Arch Dermatol* 134: 207-214.
- FUKUDA, H., CASAS, A., BATLLE, A. (2005) Aminolevulinic acid: from its unique biological function to its star role in photodynamic therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37: 272-276.
- GADMAR, O. B., MOAN, J., SCHEIE, E., MA, L. W., PENG, Q. (2002) The stability of 5-aminolevulinic acid in solution. *J Photochem Photobiol B* 67: 187-193.
- GARSON, J. C., DOUCET, J., LÉVÊQUE, J.-L., TSOUCARIS, G. (1991) Oriented structure in human stratum corneum revealed by X-ray diffraction. *J Invest Dermatol* 96: 43-49.
- GERSCHER, S., CONNELLY, J. P., BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, G. M., MACROBERT, A. J., WATT, P., RHODES, L. E. (2001) A quantitative assessment of protoporphyrin IX metabolism and phototoxicity in human skin following dose-controlled delivery of the prodrugs 5-aminolaevulinic acid and 5-aminolaevulinic acid-n-pentylester. *Br J Dermatol* 144: 983-990.

- GERSCHER, S., CONNELLY, J. P., GRIFFITHS, J., BROWN, S. B., MACROBERT, A. J., WONG, G., RHODES, L. E. (2000) Comparison of the pharmacokinetics and phototoxicity of protoporphyrin IX metabolized from 5-aminolevulinic acid and two derivatives in human skin in vivo. *Photochem Photobiol* 72: 569-574.
- GILBERT, J., HADGRAFT, J., BYE, A., BROOKES, L. (1986) Drug release from Pluronic F-127 Gels. *Int. J. Pharm.* 32: 223-228.
- GILBERT, J. C., RICHARDSON, J. L., DAVIES, M. C., PALIN, K. J., HADGRAFT, J. (1987) The effect of solutes and polymers on the gelation properties of pluronic F-127 solutions for controlled drug delivery *Journal of Controlled Release* 5: 113-118.
- GOLDEN, G. M., MCKIE, J. E., POTTS, R. O. (1987) Role of stratum corneum lipid fluidity in transdermal drug flux. *J Pharm Sci* 76: 25-28.
- GOLDEN, G. M., GUZEK, D. B., HARRIS, R. R., MCKIE, J. E., POTTS, R. O. (1986) Lipid thermotropic transitions in human stratum corneum. *J Invest Dermatol* 86: 255-259.
- GRÜNING, N. (2007) Entwicklung und Charakterisierung eines halbfesten Systems zur Verbesserung der Permeation von 5-Aminolävulinsäure durch exzidiertes humanes Stratum Corneum. Carolo Wilhelmina Universität zu Braunschweig, Braunschweig.
- GRÜNING, N., MÜLLER-GOYMAN, C. C. (2008) Physicochemical characterisation of a novel thermogelling formulation for percutaneous penetration of 5-aminolevulinic acid. *J Pharm Sci* 97: 2311-2323.
- GÜNZLER, H., GREMLICH, H-U. (2003) IR-Spektroskopie: Eine Einführung
- GUY, R. H., HADGRAFT, J. (1988) Physicochemical aspects of percutaneous penetration and its enhancement. *Pharm Res* 5: 753-758.
- HARMS, M. (2003) Einfluss von Temperatur und Wassergehalt auf das ternäre System IPM/Lecithin/Wasser (Diplomarbeit) Carolo Wilhelmina Universität zu Braunschweig.
- HARTH, Y., HIRSHOWITZ, B., KAPLAN, B. (1998) Modified topical photodynamic therapy of superficial skin tumors, utilizing aminolevulinic acid, penetration enhancers, red light, and hyperthermia. *Dermatol Surg* 24: 723-726.
- HIGUCHI, W. I. (1962) Analysis of data on the medicament release from ointments. *J Pharm Sci* 51: 802-804.
- HO, J., GUTHRIE, R., TIECKELMANN, H. (1986) Detection of delta-aminolevulinic acid, porphobilinogen and porphyrins related to heme biosynthesis by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 375: 57-63.
- HOLMQVIST, P., ALEXANDRIDIS, P., LINDMAN, B. (1997) Phase Behavior and Structure of Ternary Amphiphilic Block Copolymer-Alkanol-Water Systems: Comparison of Poly(ethylene oxide)/Poly(propylene oxide) to Poly(ethylene oxide)/Poly(tetrahydrofuran) Copolymers. *Langmuir* 13: 2471-2479.
- HOLMQVIST, P., ALEXANDRIDIS, P., LINDMAN, B. (1998) Modification of the Microstructure in Block Copolymer-Water-“Oil” Systems by Varying the Copolymer Composition and the “Oil” Type: Small-Angle X-ray Scattering and Deuterium-NMR Investigation. *J. Phys. Chem. B* 102: 1149-1158.
- ILIEV, D., HINNEN, U., ELSNER, P. (1997) Skin roughness is negatively correlated to irritation with DMSO, but not with NaOH and SLS. *Exp Dermatol* 6: 157-160.
- IVANOVA, R., LINDMAN, B., ALEXANDRIDIS, P. (2000a) Effect of Glycols on the Self-Assembly of Amphiphilic Block Copolymers in Water. 1. Phase Diagrams and Structure Identification. *Langmuir* 16: 3660-3675.

- IVANOVA, R., LINDMAN, B., ALEXANDRIDIS, P. (2000b) Evolution in Structural Polymorphism of Pluronic F127 Poly(ethylene oxide)–Poly(propylene oxide) Block Copolymer in Ternary Systems with Water and Pharmaceutically Acceptable Organic Solvents: From “Glycols” to “Oils”. *Langmuir* 16: 9058-9069.
- IVANOVA, R., LINDMAN, B., ALEXANDRIDIS, P. (2002) Effect of pharmaceutically acceptable glycols on the stability of the liquid crystalline gels formed by Poloxamer 407 in water. *J Colloid Interface Sci* 252: 226-235.
- JORI, G. (1990) Factors controlling the selectivity and efficiency of tumour damage in photodynamic therapy. *Lasers in Medical Science* 5: 115-120.
- JUHASZ, J., LENAERTS, V., RAYMOND, P., ONG, H. (1989) Diffusion of rat atrial natriuretic factor in thermoreversible poloxamer gels. *Biomaterials* 10: 265-268.
- JUNGINGER, H. E., VERHOEF, J. (1998) Macromolecules as safe penetration enhancers for hydrophilic drugs-a fiction? *Pharmaceutical Science & Technology Today* 1: 370-376.
- JUZENIENE, A., JUZENAS, P., IANI, V., MOAN, J. (2002) Topical application of 5-aminolevulinic acid and its methylester, hexylester and octylester derivatives: considerations for dosimetry in mouse skin model. *Photochem Photobiol* 76: 329-334.
- KABANOV, A., ZHU, J., ALAKHOV, V. (2005) Pluronic Block Copolymers for Gene Delivery. *Adv Genet* 53PA: 231-261.
- KABANOV, A. V., ALAKHOV, V. Y. (2002) Pluronic block copolymers in drug delivery: from micellar nanocontainers to biological response modifiers. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 19: 1-72.
- KABANOV, A. V., BATRAKOVA, E. V., ALAKHOV, V. Y. (2002) Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J Control Release* 82: 189-212.
- KARRER, S., SZEIMIES, R. M., ABELS, C., LANDTHALER, M. (1998) The use of photodynamic therapy for skin cancer *Onkologie* 21: 20-27.
- KENNEDY, J. C., POTTIER, R. H. (1992) Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 14: 275-292.
- KIM, S. Y., HA, J. C., LEE, Y. M. (2000) Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide)/poly(epsilon-caprolactone) (PCL) amphiphilic block copolymeric nanospheres. II. Thermo-responsive drug release behaviors. *J Control Release* 65: 345-358.
- KLIGMAN, A. M., CHRISTOPHERS, E. (1963) Preparation of Isolated Sheets of Human Stratum Corneum. *Arch Dermatol* 88: 702-705.
- LANDH, T. (1994) Phase Behavior in the System Pine Needle Oil Monoglycerides-Poloxamer 407-Water at 20.degree. *J. Phys. Chem.* 98: 8453-8467.
- LANDMANN, L. (1991) Die Permeabilitätsbarriere unserer Haut. *Pharmazie in unserer Zeit* 4 (20. Jahrgang)
- LATSCH, S., SELZER, T., FINK, L., KREUTER, J. (2004) Determination of the physical state of norethindrone acetate containing transdermal drug delivery systems by isothermal microcalorimetry, X-ray diffraction, and optical microscopy. *Eur J Pharm Biopharm* 57: 383-395.
- LEE, S., KOLLIAS, N., MCAULIFFE, D. J., FLOTTE, T. J., DOUKAS, A. G. (1999) Topical drug delivery in humans with a single photomechanical wave. *Pharm Res* 16: 1717-1721.
- LEOPOLD, C. S., LIPPOLD, B. C. (1995a) An attempt to clarify the mechanism of the penetration enhancing effects of lipophilic vehicles with differential scanning calorimetry (DSC). *J Pharm Pharmacol* 47: 276-281.



- LEOPOLD, C. S., LIPPOLD, B. C. (1995b) Enhancing effects of lipophilic vehicles on skin penetration of methyl nicotinate in vivo. *J Pharm Sci* 84: 195-198.
- LIN, W. J., HUANG, L. I. (2001) Influence of pluronics on protein-loaded poly(epsilon-caprolactone) microparticles. *J Microencapsul* 18: 191-197.
- LIU, T., CHU, B. (2000) Formation of homogeneous gel-like phases by mixed triblock copolymer micelles in aqueous solution: FCC to BCC phase transition. *J. Appl. Cryst.* 33: 727-730.
- LOPES, L. B., LOPES, J. L., OLIVEIRA, D. C., THOMAZINI, J. A., GARCIA, M. T., FANTINI, M. C., COLLETT, J. H., BENTLEY, M. V. (2006) Liquid crystalline phases of monoolein and water for topical delivery of cyclosporin A: characterization and study of in vitro and in vivo delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 63: 146-155.
- LOPEZ, R. F., BENTLEY, M. V., DELGADO-CHARRO, M. B., GUY, R. H. (2001) Iontophoretic delivery of 5-aminolevulinic acid (ALA): effect of pH. *Pharm Res* 18: 311-315.
- LOPEZ, R. F., LANGE, N., GUY, R., BENTLEY, M. V. (2004) Photodynamic therapy of skin cancer: controlled drug delivery of 5-ALA and its esters. *Adv Drug Deliv Rev* 56: 77-94.
- LOPEZ, R. F., BENTLEY, M. V., DELGADO-CHARRO, M. B., SALOMON, D., VAN DEN BERGH, H., LANGE, N., GUY, R. H. (2003) Enhanced delivery of 5-aminolevulinic acid esters by iontophoresis in vitro. *Photochem Photobiol* 77: 304-308.
- LUZZATI, V., MUSTACCHI, H., SKOULIOS, A., HUSSON, F. (1960) La Structure des Colloides d'Association. I. Les Phases Liquide-Cristallines des Systemes Amphiphile-Eau. *Acta Cryst.* 13: 660-667.
- MACCORMACK, M. A. (2008) Photodynamic therapy in dermatology: an update on applications and outcomes. *Semin Cutan Med Surg* 27: 52-62.
- MALMINEN, M., KOIVUKANGAS, V., PELTONEN, J., KARVONEN, S. L., OIKARINEN, A., PELTONEN, S. (2003) Immunohistological distribution of the tight junction components ZO-1 and occludin in regenerating human epidermis. *Br J Dermatol* 149: 255-260.
- Martindale (2009) The Complete Drug Reference 36th Edition.
- MAYOL, L., QUAGLIA, F., BORZACCHIELLO, A., AMBROSIO, L., LA ROTONDA, M. I. (2008) A novel poloxamers/hyaluronic acid in situ forming hydrogel for drug delivery: rheological, mucoadhesive and in vitro release properties. *Eur J Pharm Biopharm* 70: 199-206.
- MCCARRON, P. A., DONNELLY, R. F., ANDREWS, G. P., WOOLFSON, A. D. (2005) Stability of 5-aminolevulinic acid in novel non-aqueous gel and patch-type systems intended for topical application. *J Pharm Sci* 94: 1756-1771.
- MEYER-BETZ, F. (1913) Untersuchungen über die biologische (photodynamische) Wirkung des Hämatoporphyrins und anderer Derivative des Blut- Gallenfarbstoffes. *Dtsch. Arch. Klin. Med.* 112: 476-503.
- MITRA, A., STABLES, G. I. (2006) Topical photodynamic therapy for non-cancerous skin conditions. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 3: 116-127.
- MIYAZAKI, S., TOBIYAMA, T., TAKADA, M., ATTWOOD, D. (1995) Percutaneous absorption of indomethacin from pluronic F127 gels in rats. *J Pharm Pharmacol* 47: 455-457.
- MOAN, J., MA, L. W., JUZENIENE, A., IANI, V., JUZENAS, P., APRICENA, F., PENG, Q. (2003) Pharmacology of protoporphyrin IX in nude mice after application of ALA and ALA esters. *Int J Cancer* 103: 132-135.
- MOGHIMI, S. M., HUNTER, A. C. (2000) Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine. *Trends Biotechnol* 18: 412-420.

- MORTENSEN, K. (1996) Structural studies of aqueous solutions of PEO-PPO-PEO triblock copolymers, their micellar aggregates and mesophases; a small-angle neutron scattering study. *Journal of Physics: Condensed Matter* 8: A103-A124.
- MORTENSEN, K., PEDERSEN, J. S. (1993) Structural study on the micelle formation of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymer in aqueous solution. *Macromolecules*, 26 805-812.
- MORTENSEN, K., TALMON, Y. (1995) Cryo-TEM and SANS Microstructural Study of Pluronic Polymer Solutions. *Macromolecules* 28: 8829-8834.
- MORTON, C. A., WHITEHURST, C., MCCOLL, J. H., MOORE, J. V., MACKIE, R. M. (2001) Photodynamic therapy for large or multiple patches of Bowen disease and basal cell carcinoma. *Arch Dermatol* 137: 319-324.
- MÜLLER-GOYMANN, C. C. (2004) Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *Eur J Pharm Biopharm* 58: 343-356.
- NAIR, V., PANCHAGNULA, R. (2003) Poloxamer gel as vehicle for transdermal iontophoretic delivery of arginine vasopressin: evaluation of in vivo performance in rats. *Pharmacol Res* 47: 555-562.
- NEUBERT, R., SCHMALFUß, U., WOHLRAB, W., HUSCHKA, C. (1996) Wirkstoffpenetration in die Haut und deren Modulation. *Pharmazeutische Zeitung* 17(141. Jahrgang): 1483-1493.
- NOVO, M., HUTTMANN, G., DIDDENS, H. (1996) Chemical instability of 5-aminolevulinic acid used in the fluorescence diagnosis of bladder tumours. *J Photochem Photobiol B* 34: 143-148.
- O'RIORDAN, K., AKILOV, O. E., HASAN, T. (2005) The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2: 247-262.
- ODLAND, G. F. (1960) A submicroscopic granular component in human epidermis. *J Invest Dermatol* 34: 11-15.
- OLIVIERI, L., SEILLER, M., BROMBERG, L., BESNARD, M., DUONG, T. N., GROSSIORD, J. L. (2003) Optimization of a thermally reversible W/O/W multiple emulsion for shear-induced drug release. *J Control Release* 88: 401-412.
- ORECCHIONI, A. M., COUARRAZE, G., GROSSIORD, J. L., SEILLER, M., PUISIEUX, F. (1984) Viscoelastic properties of paracrystalline phases appearing in water-surface agent-oil diagrams *Int. J. Cosm. Sci.* 6: 131-143.
- PAAVOLA, A., KILPELAINEN, I., YLIRUUSI, J., ROSENBERG, P. (2000) Controlled release injectable liposomal gel of ibuprofen for epidural analgesia. *Int J Pharm* 199: 85-93.
- PANDIT, N. K., MCINTYRE, H. J. (1997) Cosolvent effects on the gel formation and gel melting transitions of Pluronic F127 gels. *Pharm Dev Technol* 2: 181-184.
- PEARSE, A. D. (2002) Applications for topical PDT: basal cell carcinomas. *Photodyn. News* 5: 1-5.
- PENG, Q., SOLER, A. M., WARLOE, T., NESLAND, J. M., GIERCKSKY, K. E. (2001) Selective distribution of porphyrins in skin thick basal cell carcinoma after topical application of methyl 5-aminolevulinate. *J Photochem Photobiol B* 62: 140-145.
- PENG, Q., MOAN, J., WARLOE, T., IANI, V., STEEN, H. B., BJORSETH, A., NESLAND, J. M. (1996) Build-up of esterified aminolevulinic-acid-derivative-induced porphyrin fluorescence in normal mouse skin. *J Photochem Photobiol B* 34: 95-96.
- Pharmacopoea Helvetica (1997) 8. Ausgabe.
- Pharmazeutische Stoffliste (2009) 16. Auflage.

- PILLAI, O., PANCHAGNULA, R. (2003) Transdermal delivery of insulin from poloxamer gel: ex vivo and in vivo skin permeation studies in rat using iontophoresis and chemical enhancers. *J Control Release* 89: 127-140.
- POLO, L., VALDUGA, G., JORI, G., REDDI, E. (2002) Low-density lipoprotein receptors in the uptake of tumour photosensitizers by human and rat transformed fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 10-23.
- RAAB, O. (1900) Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien.
- RHODES, L. E., TSOUKAS, M. M., ANDERSON, R. R., KOLLIAS, N. (1997) Iontophoretic delivery of ALA provides a quantitative model for ALA pharmacokinetics and PpIX phototoxicity in human skin. *J Invest Dermatol* 108: 87-91.
- RIBAUD, C., GARSON, J. C., DOUCET, J., LEVEQUE, J. L. (1994) Organization of stratum corneum lipids in relation to permeability: influence of sodium lauryl sulfate and preheating. *Pharm Res* 11: 1414-1418.
- RICCI, E., LUNARDI, L., NANCLARES, D., MARCHETTI, J. (2005) Sustained release of lidocaine from Poloxamer 407 gels. *International Journal of Pharmaceutics* 288: 235-244.
- RICCI, E. J., BENTLEY, M. V., FARAH, M., BRETAS, R. E., MARCHETTI, J. M. (2002) Rheological characterization of Poloxamer 407 lidocaine hydrochloride gels. *Eur J Pharm Sci* 17: 161-167.
- ROSE, C. (1999) Stabilitätsbeurteilung von O/W-Cremes auf Basis der Wasserhaltigen Hydrophilen Salbe DAB 1996. Dissertation.
- ROSEVEAR, F. B. (1954) The Microscopy of the Liquid Crystalline Neat and Middle Phases of Soaps and Synthetic Detergents. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 31: 628-639.
- ROSS-MURPHY, S. B. (1994) Rheological Characterisation of Gels. *Journal of Texture Studies* 26: 391-400.
- Rote Liste (2010)
- ROTH, M. (1971) Fluorescence reaction for amino acids. *Anal Chem* 43: 880-882.
- RÜCKER, G., NEUGEBAUER, M., WILLEMS, G.G. (2001) Instrumentelle pharmazeutische Analytik
- SAVIC, S., MILIC, J., VULETA, G., PRIMORAC, M. (2002) Physical characteristics of o/w emulsions based on acrylate polymeric emulsifiers or combination polymeric emulsifier/non-ionic emulsifier. *STP Pharma. Sci.* 12: 321-327.
- SCHMOLKA, I. R. (1972) Artificial skin. I. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns. *J Biomed Mater Res* 6: 571-582.
- SCHMOLKA, I. R. (1991) A comparison of block copolymer surfactant gels. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 68: 206-209.
- SCHURER, N. Y., ELIAS, P. M. (1991) The biochemistry and function of stratum corneum lipids. *Adv Lipid Res* 24: 27-56.
- SCHWEITZER, V. G. (2001) PHOTOFRIN-mediated photodynamic therapy for treatment of early stage oral cavity and laryngeal malignancies. *Lasers Surg Med* 29: 305-313.
- SHARMA, P. K., BHATIA, S. R. (2004) Effect of anti-inflammatories on Pluronic F127: micellar assembly, gelation and partitioning. *Int J Pharm* 278: 361-377.

- SHARMA, P. K., REILLY, M. J., JONES, D. N., ROBINSON, P. M., BHATIA, S. R. (2008a) The effect of pharmaceuticals on the nanoscale structure of PEO-PPO-PEO micelles. *Colloids Surf B Biointerfaces* 61: 53-60.
- SHARMA, P. K., REILLY, M. J., BHATIA, S. K., SAKHITAB, N., ARCHAMBAULT, J. D., BHATIA, S. R. (2008b) Effect of pharmaceuticals on thermoreversible gelation of PEO-PPO-PEO copolymers. *Colloids Surf B Biointerfaces* 63: 229-235.
- SHIN, S. C., CHO, C. W. (1997) Physicochemical characterizations of piroxicam-poloxamer solid dispersion. *Pharm Dev Technol* 2: 403-407.
- SHIN, S. C., KIM, J. Y. (2000) Enhanced permeation of triamcinolone acetonide through the buccal mucosa. *Eur J Pharm Biopharm* 50: 217-220.
- SHIN, S. C., CHO, C. W., OH, I. J. (2001) Effects of non-ionic surfactants as permeation enhancers towards piroxicam from the poloxamer gel through rat skins. *Int J Pharm* 222: 199-203.
- SINHA, V. R., KAUR, M. P. (2000) Permeation enhancers for transdermal drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm* 26: 1131-1140.
- SMALL, D. M. (1988) The physical chemistry of lipids: from alkanes to phospholipids *Handbook of lipid research* 4 (2. Auflage).
- SOLER, A. M., WARLOE, T., BERNER, A., GIERCKSKY, K. E. (2001) A follow-up study of recurrence and cosmesis in completely responding superficial and nodular basal cell carcinomas treated with methyl 5-aminolaevulinate-based photodynamic therapy alone and with prior curettage. *Br J Dermatol* 145: 467-471.
- STAR, W. M., AALDERS, M. C. G., SAC, A., STERENBORG, H. J. C. M. (2002) Quantitative Model Calculation of the Time-dependent Protoporphyrin IX Concentration in Normal Human Epidermis After Delivery of ALA by Passive Topical Application or Iontophoresis. *Photochemistry and Photobiology* 75: 429-432.
- STELUTI, R., DE ROSA, F. S., COLLETT, J. H., BENTLEY, M. V. L. B. (2001) In vitro skin retention and permeation studies for 5-aminolevulinic acid: effect of a lipid penetration enhancer *Eur. J. Pharm. Sci* 13
- STRYER, L. (1990) *Biochemie* 4. Auflage.
- SWEENEY, T. M., DOWNING, D. T. (1970) The role of lipids in the epidermal barrier to water diffusion. *J Invest Dermatol* 55: 135-140.
- SZEIMIES, R. M., DRÄGER, J., ABELS, C. (2001) History of photodynamic therapy in dermatology. *Photodynamic Therapy and Florescence Diagnosis in Dermatology*: 3-16.
- SZEIMIES, R. M., KARRER, S., RADAKOVIC-FIJAN, S., TANEW, A., CALZAVARA-PINTON, P. G., ZANE, C., SIDOROFF, A., HEMPEL, M., ULRICH, J., PROEBSTLE, T., MEFFERT, H., MULDER, M., SALOMON, D., DITTMAR, H. C., BAUER, J. W., KERNLAND, K., BRAATHEN, L. (2002) Photodynamic therapy using topical methyl 5-aminolevulinate compared with cryotherapy for actinic keratosis: A prospective, randomized study. *J Am Acad Dermatol* 47: 258-262.
- TAKATS, Z., VEKEY, K., HEGEDUS, L. (2001) Qualitative and quantitative determination of poloxamer surfactants by mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 15: 805-810.
- TIDDY, G. J. T. (1980) Surfactant-Water Liquid Crystal Phases. *Phys. Rep.* 57: 1-46.
- TIRNAKSIZ, F., ROBINSON, J. R. (2005) Rheological, mucoadhesive and release properties of pluronic F-127 gel and pluronic F-127/polycarbophil mixed gel systems. *Pharmazie* 60: 518-523.
- VADNERE, M., AMIDON, G., LINDENBAUM, S., HASLAM, J. L. (1984) Thermodynamic studies on the gel-sol transition of some pluronic polyols *International Journal of Pharmaceutics* 22: 207-218.

- VALENTA, C., AUNER, B. G. (2004) The use of polymers for dermal and transdermal delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 58: 279-289.
- VALENTA, C., CHRISTEN, B., BERNKOP-SCHNURCH, A. (1998) Chitosan-EDTA conjugate: a novel polymer for topical gels. *J Pharm Pharmacol* 50: 445-452.
- VALENTA, C., AUNER, B. G., LOIBL, I. (2005) Skin permeation and stability studies of 5-aminolevulinic acid in a new gel and patch preparation. *J Control Release* 107: 495-501.
- VAN DEN AKKER, J. T. H. M., IANIA, V., STARB, W. M., STERENBORGB, H. J. C. M., MOAN, J. (2000) Topical Application of 5-Aminolevulinic Acid Hexyl Ester and 5-Aminolevulinic Acid to Normal Nude Mouse Skin: Differences in Protoporphyrin IX Fluorescence Kinetics and the Role of the Stratum Corneum. *Photochemistry and Photobiology* 72: 681-689.
- VAN DEN AKKER, J. T. H. M., HOLROYD, J. A., VERNON, D. I., STERENBORG, H. J. C. M., BROWN, S. B. (2003) Comparative in vitro percutaneous penetration of 5-aminolevulinic acid and two of its esters through excised hairless mouse skin. *Lasers in Surgery and Medicine* 33: 173-181.
- VAN DEN AKKER, J. T. H. M., BOOT, K., VERNON, D. I., BROWN, S. B., GROENENDIJK, L., GERARD C. VAN RHOON, G. C., STERENBORG, H. J. C. M. (2004) Effect of elevating the skin temperature during topical ALA application on in vitro ALA penetration through mouse skin and in vivo PpIX production in human skin. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3: 263-267.
- VAN HEMELRIJCK, C., MÜLLER-GOYMANN, C.C. (2011) Characterization of a pseudo ternary phase diagram of poloxamer 407 systems for potential application of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy. *Int J Pharm.* 420(2):297-303.
- VON TAPPEINER, H., JESIONEK, A. (1903) Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. *Münch Med Wochenschr* 47
- WANG, P. L., JOHNSTON, T. P. (1993) Enhanced stability of two model proteins in an agitated solution environment using poloxamer 407. *J Parenter Sci Technol* 47: 183-189.
- WANKA, G., HOFFMANN, H., ULBRICHT, W. (1990) The aggregation behavior of poly-(oxyethylene)-poly-(oxypropylene)-poly-(oxyethylene)-block-copolymers in aqueous solution. *Colloid & Polymer Science* 268: 101-117.
- WANKA, G., HOFFMANN, H., ULBRICHT, W. (1994) Phase Diagrams and Aggregation Behavior of Poly(oxyethylene)-Poly(oxypropylene)-Poly(oxyethylene) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions. *Macromolecules* 27: 4145-4159.
- WEBBER, J., KESSEL, D., FROMM, D. (1997) Plasma levels of protoporphyrin IX in humans after oral administration of 5-aminolevulinic acid. *J Photochem Photobiol B* 37: 151-153.
- WEI, G., XU, H., DING, P. T., LI, S. M., ZHENG, J. M. (2002) Thermosetting gels with modulated gelation temperature for ophthalmic use: the rheological and gamma scintigraphic studies. *J Control Release* 83: 65-74.
- WENZEL, J. G., BALAJI, K. S., KOUSHIK, K., NAVARRE, C., DURAN, S. H., RAHE, C. H., KOMPPELLA, U. B. (2002) Pluronic F127 gel formulations of deslorelin and GnRH reduce drug degradation and sustain drug release and effect in cattle. *J Control Release* 85: 51-59.
- WERTZ, P. W., DOWNING, D. T. (1989) Stratum corneum: biological and biochemical considerations. *Transdermal drug delivery*: 1-22.
- WIECHERS, J. W. (1989) The barrier function of the skin in relation to percutaneous absorption of drugs. *Pharm Weekbl Sci* 11: 185-198.
- WINKLER, A. (2005) Untersuchungen zur Permeation von 5-Aminolävulinsäure (ALA) und ALA-n-butylester durch exzidiertes humanes Stratum corneum und organotypisches Hautkonstrukt. Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

- WINKLER, A., MÜLLER-GOYMANN, C. C. (2005) The influence of topical formulations on the permeation of 5-aminolevulinic acid and its n-butyl ester through excised human stratum corneum. *Eur J Pharm Biopharm* 60: 427-437.
- WOODLE, M. C., NEWMAN, M. S., MARTINA, F. J. (1992) Liposome leakage and blood circulation: Comparison of adsorbed block copolymers with covalent attachment of PEG *International Journal of Pharmaceutics* 88: 327-334.
- YAMAUCHI, P. S., LOWE, N. J., LASK, G. P., PATNAIK, R., MOORE, D., FOLEY, P. (2002) Methyl aminolevulinate and photodynamic therapy in the treatment of actinic keratosis. *J. Invest. Dermatol* 119: 804.
- YAZDANIAN, M., CHEN, E. (1995) The effect of diethylene glycol monoethyl ether as a vehicle for topical delivery of ivermectin. *Vet Res Commun* 19: 309-319.
- YU, S. U., PARK, E. W., CHOI, Y. W. (1998) Drug Release Characteristics and Skin Irritancies of Topical Gels and Multiple Emulsion Creams Containing Kojic Acid. *Yakche Hakhoechi* 28: 87-92.
- ZEITOUNI, N. C., OSEROFF, A. R., SHIEH, S. (2003) Photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancers. Current review and update. *Mol Immunol* 39: 1133-1136.
- ZHANG, L., PARSONS, D. L., NAVARRE, C., KOMPELLA, U. B. (2002) Development and in-vitro evaluation of sustained release poloxamer 407 (P407) gel formulations of ceftiofur. *J Control Release* 85: 73-81.
- ZIEGENMEYER, J. (1989) Transdermale Applikation von Arzneistoffen *Pharmazeutische Zeitung* 18 (134. Jahrgang): 1085-1091.

